

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



**Mikroanatomické a mikrobiologické aspekty konzumace
mikromycet druhem *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:
Acaridida)** Consumption of some micromycetes by *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:
Acaridida) and its microanatomical and microbiological characteristics.

Diplomová práce

Hana Soukalová

Školitel: Prof. RNDr. Jaroslav Smrž, CSc.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně a použitou literaturu řádně citovala.

V Praze 20. 7. 2008
Poděkování

Hana Soukalová

Obsah

1	Úvod.....	Chyba! Zložka není definována.
2	Poděkování.....	6
3	Literární přehled.....	8
4	Materiál a metodika.....	11
4.1	Založení pokusu a fixace materiálu.....	11
4.2	Histologické zpracování.....	12
4.2.1	Převod do paraplastu.....	12
4.2.2	Příprava paraplastových bločků a histologických řezů.....	13
4.2.3	Odstranění paraplastu.....	13
4.2.4	Barvení Massonovým trichromem.....	13
4.2.5	Odvodnění a převod do kanadského balzámu.....	14
4.3	Izolace bakterií z homogenátu z těl roztočů.....	14
4.4	Chitinázový test.....	15
4.5	Analýza exkrementů.....	15
4.6	Fotodokumentace.....	16
5	Výsledky.....	17
5.1	<i>Protococcus</i> sp.....	17
5.2	<i>Alternaria</i> sp.....	18opravit u všech názvů!!
5.3	<i>Fusarium</i> sp.....	19
5.4	<i>Mucor racemosus</i>	20
5.5	<i>Penicillium claviforme</i>	20
5.6	<i>Penicillium griseofulvum</i>	21
5.7	<i>Verticillium</i> sp.....	21
6	Diskuze.....	22
7	Přílohy.....	26
7.1	Protococcus (5. den a 10. den).....	26
7.2	Protococcus (10. den), Alternaria sp. (5. den).....	28
7.3	Alternaria sp. (5. den).....	30
7.4	Alternaria sp. (5. den a 10. den).....	32
7.5	Alternaria (10. den).....	34
7.6	Fusarium oxysporum (5. den a 10. den).....	36
7.7	Fusarium oxysporum (10. den), Mucor racemosus (5. den, 10. den), Penicillium claviforme (10. den).....	38
7.8	Penicillium claviforme (10. den), Penicillium griseofulvum (5. den).....	40
7.9	Penicillium griseofulvum (5. den a 10. den).....	42
7.10	Verticillium (10. den).....	44
7.11	Fluorescence.....	46
7.12	Protococcus (10. den).....	48
7.13	Alternaria (10. den).....	50
7.14	Mucor racemosus (5. den a 10. den).....	52
7.15	Penicillium griseofulvum (10. den).....	54
7.16	Verticillium (10. den), Penicillium claviforme (10. den).....	56
8	Seznam použité literatury.....	58

1 Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mi různými způsoby pomohli v jejím dokončení.

Prof. RNDr. Jaroslavu Smržovi, CSc. děkuji za výběr tématu diplomové práce, vstřícnost a podporu v průběhu jejího řešení, zajištění materiálu a zapůjčení nemalé části literatury.

RNDr. Vlastě Čatské děkuji za obětavou pomoc při spravování sbírky hub a pomoc při jejich kultivaci pro jednotlivé experimenty. RNDr. Kubátové děkuji za laskavé poskytnutí kmene *Alternaria* sp. ze sbírek katedry Botaniky Přf UK. RNDr. Ždárkové děkuji za uvedení do taxonomie synantropních roztočů a za poskytnutá cenné literatury. Mgr. Tomáši Erbanovi děkuji za doplnění chovů roztočů. Mgr. Janu Mourkovi děkuji za mnoho cenných rad a všestrannou podporu. Mgr. Pavlu Němcovi, PhD děkuji za velmi rychlé a flexibilní zapůjčení fotodokumentační techniky. Doc. Pavlu Stopkovi PhD děkuji za vstřícnost při řešení mé studijní situace. Ing. Haně Major Sládkové děkuji za cenné rady při zpracování fotografií v programu Adobe Photoshop.

Za podporu děkuji své rodině a přátelům. Mgr. Haně Náseové děkuji za vše... Kolegům z Advertures s. r. o. za toleranci a podporu po celou dobu řešení diplomové práce, zejména Rodolfo Biglie děkuji mimořádnou dovolenou k dokončení práce a Martinu Babicovi za přečtení a připomínky k jazykové stránce.

Práce byla podpořena grantem **GAČR 526/ 07/ 0393**, jehož řešitelem byl Prof. RNDr. Jaroslav Smrž, CSc.

2 Úvod

Tato práce se zabývá konzumací několika druhů a kmenů mikromycet druhem roztoče *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781) (Acari: Acaridida) a porovnává způsob jakým roztoči různou nabízenou potravu přijímají a tráví. Mykofagie byla posuzována na základě výsledků několika metodických přístupů z nichž byl největší důraz kladen na histologické

zpracování trávicího traktu roztočů a analýzou jeho obsahu. Sledován byl obsah potravního bolu, jeho změny způsobené průchodem trávicím traktem a aktivity stěn trávicí trubice mající souvislost s trávením přijímané potravy. Histologie byla doplněna analýzou asociovaných bakterií, které byly izolovány z homogenátu těla roztočů konzumující v experimentech odlišné houby. Důležitou roli při konzumaci a trávení hub hraje chitinolytická aktivita. Ta byla prověřena chitinázovým testem homogenátu z těl roztočů. Pomocí fluorescenční mikroskopie byly sledovány exkrementy v preparátech hlavně pro rozlišení živých a mrtvých částic.

Souhrnně řečeno, práce má ozřejmit způsob trávení hub, zejména jejich buněčných stěn, a úlohy asociovaných bakterií v těchto procesech u volně žijícího, ale hlavně synantropního roztoče *Tyrophagus putrescentiae*.

3 Literární přehled

U mnoha saprofágních druhů roztočů byla pomocí různých metodických přístupů prokázána jejich mykofagie. Touto problematikou se zabývala například Czajkowska (1970) právě u řady synantropních roztočů. Klasickou histologickou metodikou pozoroval složení potravy v trávícím traktu ve svých pracech Smrž (například 1989, 2002a, **doplnit!!**).

V této práci zkoumaný druh *Tyrophagus putrescentiae* je zástupcem roztočů půdních společenstev hlavně v prvních stadiích sukcese, například v agroekosystémech (Smrž a Jungová, 1989) či v rekultivacích (Smrž, 2008), významným škůdcem ve skladištích obilí (Hubert et. al. 2002) a v neposlední řadě původcem alergií (Arlan et. al. 2001). Bývá také nacházen v prachu domácností po boku druhu *Dermatophagoides farinae* (Samšín et. al. 1972). Ve sbírkách plísní jej coby nepříjemného destruenta pozoroval Dueck s kolektivem (2001).

Úlohou druhu *Tyrophagus putrescentiae* ve vztahu k houbám se zabýval například Van Asselt (1999) ve svém review, kde zmiňuje opět produkci alergenů a zejména možnost houbové kontaminace potravin. Detailně se problematikou asociace tohoto roztoče a mikromycet vně i uvnitř těla a možnost účasti roztoče na šíření houby zabýval Abdel – Sater et al. (2001). *Tyrophagus putrescentiae* jako vektor hub byl studován i dalšími autory (Franzolin M. R. et. al., 1999; Hubert et. al., 2003; Hubert et. al. 2004;).

Různou kvalitou houbové potravy pro přežívání a populační růst *Tyrophagus putrescentiae* se zabýval Hubert et al. (2004). Smrž a Čatská (1987) sledovali míru konzumace několika kmenů hub roztočem. Rozsáhlou práci na toto téma publikovala Czajkowska (1970). Parkinson et al. (1991) použil produkci vajíček jako měřítko pro vhodnost různé houbové potravy druhu *Tyrophagus longior*. Různou potravu ve střevě histologickou metodou a enzymatickou aktivitu druhu pancířníka *Scheloribates laevigatus* sledoval Hubert et al. (1999). Komplexní studii zabývající se potravní preferencí při mykofagii u pancířníka *Archegeozetes longisetosus* publikovali Smrž a Norton (2004). Právě u pancířníků (Oribatida), velmi těsně příbuzných se zákožkovci (Acaridida), představovala mykofágie častý objekt studia. Autoři se pokoušeli stanovovat potravní selekci různými metodami. Nejklůsativější představuje již při taxonomických a faunistických studiích běžné projasňování v kyselině mléčné a sledování obsahu střeva. Tato metoda ovšem neodhájí řadu struktur počínaje tekutými složkami potravy. Nepřímou metodu aplikoval u velkého spektra pancířníků Schuster (1956) a zejména Kaneko (1988) s využitím tvaru a velikosti chelicer ve

vztahu ke konzumované potravě. Ovšem ani tato metoda není úplně přesná. Asi nejčastější přístup představují studie v podstatě etologické založené na potravních testech ve formě nabídky potravy ("one-way" či "cafeteria" test) a následném sledování chování roztočů - setrvávání na potravě, pohyb chelicer a tedy předpokládaná konzumace, případně produkce exkrementů. Ovšem opět ne vždy tato metoda může detailně popsat výživu. A to zejména z hlediska nedostatku informací o trávení potravy ve střevě, jeho aktivitě a vhodnosti či uživatelnosti potravy ("palatability") (Smrž, 2002a, 2006). Další cestu představuje enzymový test. Ten použil Luxton (1972) a díky jemu rozlišil tři hlavní potravní skupiny u pancířníků - panfytofágy konzumující s minimální selektivitou, mikrofytofágy konzumující mikroorganismy (houby, bakterie, řasy) a makrofytofágy živící se rostlinným opadem. Potravní skupiny - tzv. guildy - pomocí analýzy enzymů stanovili i Siepel a de Ruiter-Dijkman (1993). Nepřímou metodu založenou na poměru izotopů dusíku ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) v těle roztočů použila i Schneider et al. (2004).

Významnou metodu představuje mikroanatomie vycházející z histologického zpracování roztočů. Obecně, zřejmě kvůli velikosti, a u pancířníků pro silnou sklerotizaci, práci řešených touto metodikou není mnoho (Pauly, 1956; Woodring, 1962; Smrž, 1989). Významným materiálem pro orientaci v mikroanatomii pancířníků a akaroidních roztočů je Smržova (1991) disertační práce, kde je detailně zpracován i druh *Tyrophagus putrescentiae*. Efekt konzumace půdních hub na mikroanatomii *Tyrophagus putrescentiae* popsali Smrž a Čatská (1989). Práci srovnávající ultrastrukturu střeva larev a dospělců druhů *Platytrombidium fasciatum* (C. L. Koch, 1836) and *Camerotrombidium pexatum* (C. L. Koch, 1837) (Acariformes: Microtrombidiidae) publikoval Šatrov (2003). Typy a rolemi hemocytů ve vnitřních procesech pancířníků i druhu *Tyrophagus putrescentiae* se zabýval Smrž (2006). Prostorový model trávicího systému druhu *Dermatophagoides farinae* sestavil Zhang et al. (2008). Velmi podrobnou práci zabývající se ultrastrukturou trávicí soustavy druhu *Acarus siro* publikoval Šobotník et al. (2008). Práce obsahuje 3D model trávicího systému a obsáhlý popis buněčných struktur trávicího traktu.

Potravní biologií pancířníků a zákožkovců se zabývá Smrž (1989, 2002, 2006). Z těchto prací vyplývá nutnost multimetodického přístupu, který zahrnuje mikroanatomii založenou na histologických řezech, analýzu exkrementů zejména ve fluorescenčním osvětlení, testy pro enzymy trávicí obtížně rozložitelné látky (chitin, celulóza), izolaci mikroorganismů z homogenátu roztočů a stanovení jejich aktivity. Tak byl i vybudován systém parametrů hodnotících ve výsledku vhodnost ("palatability") přijímané potravy (Smrž, 2002b):

- složení potravního bolu (balíčku);
- naplnění střeva potravou (jedné či všech tří částí - mesenteron, colon, rectum);
- aktivita stěn střeva včetně mesenterálních caek, proliferace buněk, apokrinní sekrece;
- živé, intaktní, či mrtvé, ztrávené buňky v exkrementu;
- deposita zásobních látek (glykogen);
- deposita metabolitu (guanin) v mesenchymu či stěnách střeva;
- volné buňky v mesenchymu - hemocyty;
- tělesa asociovaných bakterií v mesenchymu;
- chitinolytická či celulolytická aktivita homogenátu roztočů;
- izolace dominantních bakterií z homogenátu roztočů;
- chitinolytická či celulolytická aktivita těchto bakterií;
- přímý efekt na nabízené mikromycety;

Asociace roztočů a bakterií při trávicích procesech, některými autory (Luxton, 1972; Zinkler et al., 1986; Siepel a Ruiter-Dijkman, 1993) zpochybňovaná byla histologicky a kultivačně prokázána v několika pracích (Smrž, 2002, 2003, 2006, Smrž et al., 1991; Smrž a Trelová, 1995). Z homogenátu roztočů byly vyizolovány kmeny bakterií, z nichž většina vykazovala chitinolytickou aktivitu (Smrž a Soukalová 2008; Smrž 1998, 2000; Smrž et al., 1991).

Naopak o autochtonním lysozymu jako enzymu umožňující akaroidním roztočům trávit bakteriální potravu uvažují Erban a Hubert (2008).

4 Materiál a metodika

Pro výzkum byl nutný chov druhu *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781) čítající několik tisíc jedinců. K založení chovu pro účely diplomové práce byli z nejprve použiti jedinci z chovů Oddělení bezobratlých PřF UK pocházející z vojtěškového pole u Prahy, v druhé polovině pak chovy z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni. Roztoči byli chováni v petriho miskách o průměru 5 cm s kulturou houby *Alternaria* sp. ze sbírek oddělení bezobratlých katedry Zoologie na PřF UK v Praze při laboratorní teplotě i vlhkosti. Houba byla očkovaná na malt extrakt agar o pH cca 6,7. Chovy byly před vyschnutím chráněny uzavřením v plastových boxech.

Mykofagie druhu *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781) a jeho asociace s chitinolytickými bakteriemi byla testována několika různými metodami. Hlavními nástroji bylo histologické zpracování trávicího traktu roztočů chovaných na různých houbách a izolace bakterií z homogenátu těl roztočů. Takto získaná data byla doplněna chitinázovým testem a fluorescenční mikroskopií.

Kmeny hub, které byly vybrány k testování mykofagie jsou všechny významné fytopatogeny, některé známé pro svou produkci toxikologicky významných látek. Všechny pocházely ze sbírek oddělení bezobratlých katedry Zoologie PřF UK. Rod *Alternaria* byl doplněn se sbírek katedry Botaniky PřF UK. Jako kontrola byla použita kůra platanu (*Platanus orientalis*) s nárostem zelené řasy *Protococcus* sp.

4.1 Založení pokusu a fixace materiálu

Základem všech dalších experimentů bylo vysazení roztočů na fytopatogenní houby a zelenou řasu rodu *Protococcus* sp. Kmeny hub, které byly pro účely diplomové práce použity:

Alternaria sp.

Fusarium sp.

Mucor sp.

Penicillium claviforme

Penicillium griseofulvum

Verticillium sp.

Houby byly očkovány na petriho misky o průměru 5 cm s přibližně 0,5 cm vrstvou malt extrakt agaru o pH cca 6, 7 a kultivovány při laboratorní teplotě 10 dní. Tato doba byla plně dostačující pro vytvoření souvislého mohutného nárostu všech použitých kmenů. Na takto připravené petriho misky byly následně přeneseni roztoči.

V každé serii pokusu bylo přeneseno na jednotlivé houby i na nárůst zelené řasy vždy 30 dospělých jedinců na petriho misku. Každý nabízený druh potravy byl zastoupen v 5 petriho miskách. Jednotlivé typy potravy byly odděleny v plastových boxech.

Pro histologické zpracování bylo vždy 10 zvířat z každé petriho misky přeneseno do modifikované fixáže Bouin – Dubosque – Brazil (Smrž, 1989). V této lázni byli jedinci nejméně 24 hodin a poté byli převedeni do plastových epruvet s 80% ethanolem. Ethanol byl několikrát vyměněn, dokud se nevyplavily poslední zbytky původní fixáže a roztok se nepřestal barvit žlutě po kyselině pikrové. Teprve poté mohlo následovat vlastní histologické zpracování.

Zvířata byla pro histologii fixována 5. a 10. den po zahájení pokusu. 10. den proběhla také izolace bakterií z homogenátu a chitinázový test. Detailní popis dílčích kroků je popsán níže.

Pokus proběhl v 6 sériích od ledna 2007 do června 2008.

4.2 Histologické zpracování

Pro histologii byli roztoči po fixaci a uložení v 80% ethanolu nejprve převedeni do paraplastu. Poté proběhlo krájení řezů, jejich nalepení na podložní skla, odstranění paraplastu, barvení Massonovým trichromem, opětovné odvodnění a převod do kanadského balzámu. Takto připravené preparáty byly prohlíženy a fotograficky zdokumentovány.

4.2.1 Převed do paraplastu

Do paraplastu byly roztoči převedeni sérií odvodňujících lázní.

Lázeň

100% propanol

směs 100% propanolu a 100% methylbenzoátu v poměru 1 : 1

Opakování a interval

3 x 2 h

2 x 12 h

100% methylbenzoát	2 x 12 h
100% benzen	2 x 15 min
směs 100% benzen a paraplast (termostat 46°C)	2 x 12 h
paraplast (termostat 56°C)	2 x 12 h

Z paraplastové lázně byli roztoči převedeni do paraplastových bločků a krájení.

4.2.2 Příprava paraplastových bločků a histologických řezů

Paraplastová lázeň s roztoči byla pomocí nahřáté ocelové desky udržována v kapalném stavu. Roztoči byli vybírání z lázně a po 3 – 5 kusech přeneseni do plastových forem s rozehrátým paraplastem o průměru 1, 5 cm. Nahřátou preparační jehlou byla doladěna poloha zvířat ve formě. Po prudkém ochlazení paraplastových forem, ztuhnutí a vyjmutí paraplastového bločku bylo nutné jej za studena natvarovat a připevnit na dřevěné bločky pro krájení na mikrotomu.

Takto připravené bločky byly krájeny ocelovým nožem na rotačním mikrotomu Leica 2155 na řezy o tloušťce 5 µm. Pásky řezů byly lepeny k podložním sklům tenkou vrstvou směsy glycerolu a vaječného bílku v poměru 1 : 1. Pro usnadnění manipulace s právě lepenými páskami byla skla navíc pokryta několika kapkami destilované vody.

4.2.3 Odstranění paraplastu

Pro barvení Massonovým trichromem bylo nutné z řezů tkáněmi odstranit paraplast.

Lázeň	Opakování a interval
100% xylen	2 x 6 min
100% propanol	1 x 6 min
80% ethanol	1 x 5 min
destilovaná voda	1 x 5 min

4.2.4 Barvení Massonovým trichromem

Složení jednotlivých roztoků podle Jírovce (1958), Mourka (2002), časy modifikovány Smržem (nepublikováno).

Lázeň	Interval
Harrisův haematoxylin	60 min
Bazická vodovodní voda	oplach
Diferenciace kyselým alkoholem	v závislosti na průběhu diferenciace
<ul style="list-style-type: none"> - 80% ethanol s 3 – 4 kapkami HCl - Průběh diferenciace byl sledován pod binokulární lupou 	
Vodovodní voda	oplach
Destilovaná voda	oplach
Červený barvicí roztok (1% Ponceau de xilidin + 0,5 % kyselý fuchsin + 1% kyselina octová)	20 s
Destilovaná voda	2 x oplach
1% kyselina fosforwolframová	10 min
Okapání přebytečné kapaliny na filtrační papír	
Zelený barvicí roztok (1% světlá zeleň + 1% kyselina octová)	10 min
Okapání přebytečné kapaliny na filtrační papír	

4.2.5 Odvodnění a převod do kanadského balzámu

Lázeň	Opakování a interval
100% propanol	2 x 5 min
100% xylen	2 x 5 min
Okapání přebytku xylenu na filtrační papír	

Po opětovném odvodnění byly z řezů zhotoveny trvalé preparáty za použití kanadského balzámu.

4.3 Izolace bakterií z homogenátu z těl roztočů

Jak již bylo uvedeno, pro izolaci bakterií byli roztoči z pokusných chovů izolováni 10. den od startu pokusu. Z každé nabízené potravy bylo pro izolaci bakterií a zároveň pro test

chitinázové aktivity použito 10 – 15 živých jedinců. Tito jedinci byli povrchově sterilizováni v několika lázních:

Lázeň	Opakování a interval
Sterilní destilovaná voda	1 x 2 min
Sterilní destilovaná voda + kapka saponátu (Jar)	1 x 2 min
96% ethanol	2 x 2 min
Sterilní destilovaná voda	1 x 2 min

Mezi láznemi byli roztoči přenášeni entomologickou pinzetou před každým krokem sterilizovanou v plameni. Po vyjmutí z poslední lázně byli roztoči přeneseni do kapky sterilního fyziologického roztoku na sterilizovaném podložním skle. Poté byla jejich těla mechanicky rozrušena. Dvě třetiny takto získaného homogenátu byly naočkovány na petriho misky s bakteriologickým agarem o pH 6,9 – 7,1. Po izolaci jednotlivých bakteriálních kolonií a jejich následné kultivaci na šikmých agarrech, byly tyto kultury zaslány k určení do certifikované laboratoře CCM v Brně.

Jako kontrola byla na petriho misku s bakteriologickým agarem přenesen supernatant poslední lázně.

Chitinolitická aktivita zjištěných bakteriálních kmenů byla dohledána v literatuře.

4.4 Chitinázový test

Zbývající jedna třetina homogenátu z těl roztočů byla použita k testu chitinázové aktivity. Metodika podle Smrže (2000). Několik kapek homogenátu bylo nakapáno na podložní sklo s tenkou vrstvou karboxymethylchitinu na skle fixovaným 100% propanolem. Inkubační doba byla 24 hodin. Následně byla skla opláchnuta velmi jemným proudem destilované vody a po oschnutí barvena bazickým fuchsinem po dobu 2 hodin. Po obarvení byla přebytečná barva důkladně opláchnuta. V případě pozitivního testu na sklech zůstávaly v místě nakapání homogenátu neobarvené plochy.

4.5 Analýza exkrementů

Po 10. dni od startu pokusu také proběhla analýza exkrementů roztočů chovaných na jednotlivých typech potravy pomocí fluorescenční mikroskopie. Z čerstvých exkrementů byly vytvořeny preparáty s kapkou (Orange G) Ty potom byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem Provis AX70 (Olympus).

4.6 Fotodokumentace

Vhodné histologické preparáty byly fotografovány pomocí kamery RT SLIDER (Visitron Systems) nainstalované na mikroskopu Olympus BX51. Část histologického materiálu a všechny preparáty exkrementů byly fotografovány CCD kamerou Sony na mikroskopu Olympus Provis AX70. Histologické řezy byly snímány v režimu světelného pole, exkrementy potom pomocí fluorescence.

Snímky živých roztočů po 10. dni II. serie pokusu od 10. 4. do 20. 4. byly pořízeny uEye na mikroskopu Olympus S2X9 23. 4. 2007 a zpracovány programem Quick Photo Cam 2,2.

Makroskopické objekty jako například skla s výsledky chitinázového testu a konzumace hub na petriho miskách v průběhu III. Serie pokusu od 20. do 30. 6. 2007 byl použit fotoaparát Olympus C-5060 Wide Zoom.

Fotografie byly dále digitálně zpracovány programy Micro Image 3.0, 'analySIS^D' a Adobe Photoshop 7.0.

Vzhledem k různé terminologii používané při popisování trávicí soustavy, na kterou upozorňuje například Smrž ve své dizertační práci (1991), byly snímky histologických preparátů popsány podle této práce. Některé typy buněk byly v trávicí soustavě byly popsány podle Šobotníka a kol. (2008).

5 Výsledky

V průběhu experimentů byla pozorována variabilita ve způsobu přijímání a zpracování různých typů potravy. Příjem jednotlivých typů potravy, její zpracování, výsledky chitinázových testů i izolace bakterií jsou popsány v samostatných kapitolách. Důraz byl kladen zejména na obsah trávicí soustavy, složení potravy v potravním bolu a popis struktur souvisejících s trávicím procesem.

5.1 *Protococcus* sp.

Roztoči vysazení na vzorek kůry hojně porostlý řasou měli po prvním sběru (5. den) obvykle plně zaplněny všechny části trávicí soustavy (Obr. 1) V potravě se již objevovaly fragmenty buněk řas, houbových hyf a v některých případech i spory. Tyto složky byly zastoupeny v potravě nepravidelně. Sekreční buňky v caecu mesentera vykazovaly vysokou aktivitu. Pozorovány byly S buňky i D buňky (S cells, D cells podle Šobotníka et. al., 2008) . Caeca byla často vyplněna mukózními látkami. Ve stěnách mesenteronu, caec i v buňkách mesenchymu byla pozorována jasně oranžová granula glykogenu.

Jedinci zpracováni po 10. dni od vysazení na potravu měly zpravidla zaplněny všechny oddíly trávicí soustavy (Obr. 2). Potravní bolus obsahoval porušené buňky řas fragmenty hyf hub a neidentifikovanou hmotu mezi kterou byly patrné kolonie bakterií. Potrava v mesenteronu vyplňovala jeho celý objem, nicméně netvořila kompaktní bolus (Obr. 6). V colonu potravní bolus již nabývá pravidelného kulovitého tvaru na jehož povrchu se tvoří membrána. Potravní bolus průchodem trávicím traktem zvětšuje svou hustotu. V rectu je bolus obalen navíc mukózními látkami. Mesenterální caeca vykazují silnou sekreční aktivitu. Výrazně převládají D buňky s jedinou velkou terminální vakuolou (Obr. 4). Na podélných řezech se tedy tato část zobrazuje průhledně. Opět jsou ve stěnách mesenteronu dobře patrná glykogenová granula.

U některých jedinců byla zaznamenána výrazná oranžová hmota zasahující do téměř celého těla roztoče (Obr. 2 a 3). Pravděpodobně se jedná o bakteriální infekci, která je v tomto rozsahu pro jedince letální. Na fotografiích živých jedinců na potravě je tento jev dobře patrný a projevuje se jako mléčné zabarvení těla jinak bezbarvého roztoče (Obr. 53). Podobně se na fotografiích živých roztočů zobrazují guaninová depozita. Také se jedná o bílé struktury

vyplňující v terminální fázi celé tělo roztoče. V tomto případě jsou ale jasně ohraničené a neprůsvitné (Obr. 55).

Z homogenátu byly izolovány kmeny bakterií *Pseudomonas stutzeri* a *Serratia marescens*. Pokus nebyl doplněn chitinázovým testem.

5.2 *Alternaria* sp.

Jedinci, kterým byl nabídnut tento druh potravy po 5. dni pokusu vykazovali velkou variabilitu v míře zaplnění trávicího traktu potravou. Mnohdy v některém oddílu stopy po potravě chyběly úplně (Obr.10). V některých případech byla ovšem potrava ve všech oddílech trávicí soustavy. Mesenteron byl zaplněn potravou obvykle řídce (Obr. 10). Hustota poravy a kompaktnost potravního bolu opět rostla průchodem trávicí soustavou a v rektu, pokud byla přítomna, měla již pravidelný kulovitý tvar obalená tenkou mukózní vrstvou. Byla zaznamenána výrazná proliferace buněk recta (Obr. 8). V potravě byly jasně patrné fragmenty houbových hyf a výrazné několikadílné tmavé spory, často s porušenými stěnami. V lumen mesentera bylo velké množství malých bakteriálních buněk, které byly patrné, jako skupiny tmavých bodů (Obr. 9). Sekreční aktivita buněk mesenterálních caec byla silná. Dobře viditelné byly tmavě červené S buňky s patrnými mikrovili na povrchu a drobnými světlými vakuolami s trávicími enzymy (Obr. 9). Zaznamenána byla granula glykogenu, v preparátech jasně oranžové body mnohdy uspořádány do typických rosetových útvarů.

Po 10 dnech se situace změnila. Roztoči jevíli známky intenzivního příjmu potravy a zpravidla měli zcela zaplněny všechny oddíly trávicí soustavy (Obr. 14). Složení potravy ovšem zůstalo stejné. Opět zde byly četné fragmenty houbových hyf a spor. Kolonie bakterií byly patrné hojně v mesenteronu, colonu a vyplňovaly i velké prostory v mezenchymu (Obr. 16). V rectu již nebyly znatelné. Potrava průchodem trávicím traktem opět houstne, ale objem colonu a recta je téměř totožný. Je patrný kompaktní potravní bolus v colonu a rectu, ale vzhledem k naplnění těchto částí není jasně viditelný mukózní obal bolu. Aktivita buněk mesenterálních caec byla vizuálně stejná. Opět byly dobře pozorovatelná glykogenová granula v mezenchymu i ve stěnách mesentera a recta.

Zaplnění colonu a recta bylo vzhledem k průsvitnosti druhu *Tyrophagus putrescentiae* dobře patrné i na fotografiích živých jedinců pořízených také po 10. dni od počátku pokusu. Intenzivní konzumaci odpovídá i téměř spásaná kolonie houby (Obr. 52).

Z homogenátu z těl roztočů se podařilo vyizolovat bakteriální kmen *Brevundimonas vesicularis*. Chitinázový test byl jasně pozitivní.

Analýza exkrementů pomocí fluorescence ukázala mnoho zeleně zářících, tedy živých, bakteriálních buněk. V preparátu jsou patrné i nápadné tmavé spory (Obr. 44).

5.3 *Fusarium* sp.

Roztoči po 5 dnech od vysazení na tento typ potravy vykazovaly velmi nepravidelné naplnění trávicí soustavy. Pokud byl mesenteron naplněn tvořila potrava kompaktní bolus, při velmi nízkém stupni naplnění byla potrava neptavidelně rozptýlena. V colonu docházelo k zahuštění potravy a pokud se v něm nacházela potrava, byla vždy kompaktní s dobře viditelnou povrchovou vrstvou mukózních látek. V potravě byly patrné fragmenty houbových vláken, spory se v potravě vyskytovaly velice zřídka. Plné spory byly zaznamenány pouze v mesenteronu. Fragmenty houbových hyf byly zaznamenány ve všech částech trávicí soustavy (Obr. 21). Jasně patrné byly shluky bakterií ve všech odílech trávicí soustavy mimo recta, které se v lumen mesentera a mesenterálních caec jeví jako shluky jasně oddělených tmavých bodů. Aktivita sekrečních buněk mesenterálních caec byla opět vysoká. Aktivní byly oba typy sekrečních buněk, S buňky i D buňky. Světle zeleně zbarvené mukózní látky bylo možno pozorovat v prázdných oddílech trávicí soustavy.

Ve vzorcích desátých dnů pokusů byly opět naplněny zpravidla všechny tři oddíly trávicí soustavy. V potravě převládaly hyfové fragmenty a jen ojediněle se objevily spory (Obr. 23). Potrava tvořila bolus již v mesenteronu, ale pokud byl mesenteron naplněn maximálně, nebyl tvar bolu příliš patrný. V colonu je již kompaktní bolus obalený membránou. Bolus v rektu je značně zahuštěn, nicméně i zde byly patrné fragmenty houbových hyf (Obr. 26). Distálně od potravního bolu směrem k atriu je byly pozorovány dobře patrné mukózní látky. Sekreční buňky mesenterálních caec byly opět velmi aktivní. Zaznamenány byly oba typy buněk, ale převládaly D buňky. Stěny caec a mesenteronu obsahovaly glykogenová granula. Zejména v lumen mesenterálních caec, ale i v mesenteronu a mezenchymu byly zaznamenány kolonie asociovaných bakterií. Jednotlivé buňky byly patrné jako tmavé body. Převládající kmen bakterií se bohužel nepodařilo určit. Chitinázový test byl jasně pozitivní.

V preparátu s exkrementy prohlíženém ve flourescenčním světle nebyly patrné žádné svítící body, které by odpovídaly živým bakteriím. Pozorovány byly jasně zelené fragmenty živých houbových hyf (Obr. 45).

5.4 *Mucor racemosus*

V preparátech histologických řezů roztoči fixovanými po 5 dnech pokusu na potravě tvořené kmenem houby *Mucor racemosus* byla zaznamenána potrava ve všech částech trávicí soustavy (Obr. 28). Mesenteron obsahoval převážně masu spor. Zastoupeny byly spory plné, které měly barvu hnědou, i průhledné prázdné spory (Obr. 29). Fragmenty hyf se v potravě téměř nevyskytovaly. Významnou složku mesentera tvořily bakteriální kolonie. Bolus kulovitěho tvaru v colonu i rectu obsahoval prázdné i plné spory a fragmenty houbových hyf. Bakteriální buňky nebyly pozorovány. Mesenterální caeca opět aktivní. Glykogenová granula se vyskytovala opět ve stěnách strávícího traktu i v mesenchymu (Obr. 28). Asociované bakterie se zobrazovaly jako tmavé shluky drobných kulovitých buněk v mezenchymu.

Po 10 dnech se mírně vzrostlo množství potravy v trávicí soustavě. Mesenterální caeca vykazovala vysokou sekreční aktivitu, na které se podílely převážně D buňky (Obr. 31). Počet glykogenových granul ve stěnách mesenteronu, caec, colonu, recta i mesenchymu viditelně vzrostl.

Analýza exkrementů ukázala velké množství jasně zářících živých bakteriálních buněk a zelené živé spory (Obr. 46). Bakterie z homogenátu nebyly identifikovány. Chitinázový test vyšel jasně pozitivně.

5.5 *Penicillium claviforme*

Potrava po 10 dnech pokusu se nacházela ve všech třech oddílech trávicí soustavy. Nejsou zde patrné fragmenty mycelia, nicméně se dají rozeznat buňky asociovaných bakterií v potravě i mesenchymu a malé množství spor (Obr. 32). Potrava v mesenteronu byla amorfní a i v colonu v některých případech neměla podobu kompaktního bolu. V rectu byl již pravidelný bolus vždy. Aktivitu mesenterálních caec v tomto případě zajišťovaly převážně buňky typu D (Obr. 33). Glykogenová granula se nacházela v malém množství ve stěnách mesenteronu a v mezenchymu.

Flourescence ukázala množství živých jasně zářících bakterií a stopy kulovitých zelených bodů, které by naznačovaly živé spory (Obr. 46). Z homogenátu byla vyizolována bakterie *Serratia marescens*. Chitinázový test vyšel jasně pozitivní.

5.6 *Penicillium griseofulvum*

Potravu 5. den od nasazení roztočů na *Penicillium griseofulvum* obsahovaly všechny oddíly trávicí soustavy. Byla tvořena zejména masou spor a amorfni hmoty (Obr. 34). Spory byly plné i prázdné. Nebyly zaznamenány žádné fragmenty hyf hub. Potrava opět průchodem trávicím traktem získala tvar pravidelného potravního bolu. V mesenterálních caecách byly aktivní oba typy sekrečních buněk. V detailu S buněk byly patrná světlá granula s enzymy. V sousedství buněk mesenterálního caeca byly viditelné hemocyty. Aktivita S buněk byla zaznamenána i ve stěně mesenteronu. Asociované bakterie byly soustředěny do shluků v mesenchymu i v mesenteronu. Glykogenová granula byla dobře patrná.

Podobně jako u konzumace kmene *Alternaria*, i v tomto případě, ve vzorcích fixovaných po 10. dnech od počátku pokusu byly patrné známky intenzivního příjmu potravy. Všechny části trávicího traktu jsou maximálně naplněny potravou (Obr. 37). Tu tvoří plné i prázdné spory. Opět nejsou přítomny hyfy houby. Aktivita buněk mesenterálních caec i vlastního mesentera byla ještě zvýšená (Obr. 38). Aktivní proliferace byla pozorována u obou typů buněk v caecách, v mesenteronu pouze v případě S buněk. Masa asociovaných bakterií byla v trávicí soustavě i mezenchymu větší.

Z homogenátu byly izolovány kmeny bakterií *Serratia marescens* a *Serratia liquefaciens*. Chitinázový test byl pozitivní. V exkrementech pod flourescenčním světlem jasně zeleně zářily živé bakterie, tluměně zeleně svítily živé spory a tmavou barvu měly spory neživé (Obr. 48).

5.7 *Verticillium* sp.

Roztoči, kteří byli vysazeni na *Verticillium* sp. měli po 10. dnech v histologických preparátech zaplněny všechny oddíly trávicí soustavy potravou (Obr. 39). Mesenteron obsahoval amorfni hmotu, ve které byly rozptýleny prázdné a zřídka i plné spory a fragmenty hyf. Výraznou strukturou v lumen mesentera tvořily bakterie (Obr. 41). Ty byly také pozorovány ve velkém množství ventrálně od colonu v mezenchymu. Mesenterální caeca vykazovala proliferační aktivitu, na které se podílely zejména D buňky (Obr. 42).

Z homogenátu byla izolována bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*. Chitinázový test byl jasně pozitivní. V preparátech exkrementů pozorovaných pod fluorescencí byly opět výrazné zářící bakterie a stejně jasné oválné spory (Obr. 49).

6 Diskuze

Roztoči druhu *Tyrophagus putrescentiae* konzumují a tráví jednotlivé kmeny hub rozdílným způsobem. Jednotlivé diety se od sebe liší zejména obsahem trávicí soustavy roztočů. Test chitinolytické aktivity homogenátu byl ve všech sledovaných případech jasně pozitivní.

Roztoči konzumující kulturu houby *Alternaria sp.* měli v trávicím traktu velké množství spor a fragnemtů mycelia. Spory se zdály být přijímány neporušené. Vzhledem k tmavému zbarvení spor je obtížné zhodnotit, zda spory byly přijímány živé, nicméně v exkrementech se živé spory téměř neobjevují. Exkrementy ale velké množství spor obsahují. To by naznačovalo, že tuto houbu *Tyrophagus putrescentiae* konzumuje, ale netráví jí zcela. Vzhledem k obrovskému naplnění všech tří částí trávicí soustavy (mesenteron, colon i rectum) je houba roztoči přijímána velmi ochotně. To potvrzují u stejného druhu i Smrž s Čatskou (1987) a Hubert et. al. (2004).

Podobně byla přijímána potrava i na dietě složené z *Mucor racemosus*. Ve všech oddílech trávicí soustavy bylo velké množství spor. Střevo obsahovalo spory plné i prázdné. Téměř chyběly fragmenty hub. Po 5 dnech konzumace houby obsahoval potravní bolus v rectu velké množství živých bakterií. Po 10 dnech se ale jejich počet snížil nepřímo úměrně pozorováním vyššího množství asociovaných bakterií v těle roztočů. Tomu by odpovídalo i pozorování exkrementů pomocí fluorescence, kde jsou spory téměř neznatelné a celý snímek vyplňují jasně zářící bakterie.

Velké množství živých spor přijímali roztoči i v případě druhu *Penicillium griseofulvum*. Zde ale plné živé spory obsahovala i potrava v rectu. Toto potvrzuje i analýza exkrementu pomocí fluorescence. V něm byly kromě zářících bakterií i jasně viditelné zeleně svítící živé spory a tmavé spory mrtvé. Nicméně navzdory zhoršené schopnosti tento kmen houby trávit, jsou spory přijímány roztoči ve velkém množství. Je možné, že je takto kompenzována užitečnost houby. Nižší nutriční hodnotu této houby pro roztoče potvrzuje i relativně málo uložených glykogenových granulí v těle roztoče. Konzumaci této houby pozoroval u pancířníka *Schelorbates laevigatus* i Hubert et al. (1999)

Verticillium sp. bylo přijímáno s nízkou ochotou soudě podle porovnání stavu konzumovaných Petriho misek po 10 dnech od počátku pokusů (Obr. 58). Ke stejnému závěru došli i Smrž a Čatská (1997). Trávicí trakt byl v mém pozorování nicméně naplněn. Hlavní složku v mesenteronu tvořily prázdné spory a nevelké množství spor plných. Zajímavé je znatelná redukce množství potravy mezi jednotlivými částmi trávicí soustavy. Výrazné jsou i

bakterie v trávicím traktu a mezenchymu. Z homogenátu byl izolován kmen *Stenotrophomonas maltophilia* s potvrzenou chitinázovou aktivitou. Je tedy možné, že bakterie na prázdných sporách prosperuje, zatímco zůstává otázkou jak houbu konzumuje roztoč.

Zcela odlišně je konzumována dieta s *Fusarium oxysporum*. V tomto případě roztoči konzumují velké fragmenty mycelia. To je průchodem trávicí soustavou redukováno, ale není ztráveno zcela, jak ukazuje fluorescenční snímek exkrementu (Obr. 45). Zajímavé je, že ač bylo v trávicím traktu pozorováno velké množství bakterií a test chitinázové aktivity byl jasně pozitivní, na snímku exkrementu jsou patrné jen živé fragmenty hyf bez bakterií.

Dalším způsobem, kterým mohou roztoči konzumovat potravu i bez asociace s chitinolytickými bakteriemi je vysávání obsahu hyf (Smrž a Čatská 1989). Tímto způsobem *Tyrophagus putrescentiae* pravděpodobně konzumuje kmen *Penicillium claviforme*. V mesenteronu ani jiném oddílu trávicího traktu nebyly zaznamenány jakékoli fragmenty hyf ani spor. Velmi dobře pozorovatelné bylo velké množství asociovaných bakterií. Z homogenátu byly izolovány druhy *Serratia marcescens* a *Serratia liquefaciens*. Oba chitinolytické, což bylo potvrzeno v literatuře (.....) a jasně pozitivním chitinázovým testem. Stejné složení potravního bolu a asociaci s bakterií *Serratia marcescens* potvrzuje i Smrž (2003). Exkrement obsahuje opět živé bakterie. Patrný ovšem byly i tmavé červené mrtvé spory. Vzhledem k jejich nepřítomnosti v trávicím traktu jde pravděpodobně o chybu.

V případě konzumace řas byly pozorovány v mesenteru ojedinělé fragmenty houbových hyf a spory, fragmenty řasových buněk i amorfní mukózní hmota. Různé složení potravy v trávicí soustavě pozorované ve vzorcích s řasou je způsobeno jejím heterogenním složením. Vzorek pochází z přírodních podmínek a a nárůst hub ze spor ve vyšší vlhkosti není překvapivý. Přesné druhové složení houbové kontaminace nebylo zjišťováno a vzhledem k převládajícímu sterilnímu myceliu i skoro nemožné. Situace, kdy po 5. dnech od počátku pokusu nebyly pozorovány v potravě uvnitř trávicí soustavy buňky ani fragmenty řas, je pravděpodobně způsobeno nabídkou pro roztoče atraktivnější potravy, kterou zde představuje neidentifikovaná houba.

Adaptace roztočů na jednotlivé druhy potravy nebyla hlavním námětem práce, nicméně za povšimnutí stojí některé výsledky. Hlavním rozdílem mezi přijímáním potravy po 5. dni pokusu a 10. dni pokusu bylo množství. Velmi nápadný je tento trend u kmenů *Alternaria sp.* a *Pennicillium griseofulvum*. Vyšší je také aktivita buněk mesenteronu a mesenterálních caec. Glykogenová granula u nutričně bohatých druhů prostupují buňky

mezenchymu i trávicí soustavy (*Penicillium claviforme*, *Mucor racemosus*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria*).

Jeden druh roztoče tedy konzumuje a tráví houbu různými způsoby – spásá fragmenty mycelia a celých spor (*Alternaria* sp), konzumuje pouze spory z nichž většinu ve spolupráci s bakteriemi tráví (*Mucor racemosus*), konzumuje velká množství spor, která tráví nedůsledně navzdory asociovaným, vysává spory nebo houbové hyfy. Protože ve všech případech byla prokázána chitinolytická aktivita homogenátu roztočů, pravděpodobně má na vlastní způsob konzumace hub přítomnost chitinolytických bakterií vliv menší, než bylo předpokládáno. Nicméně může pozitivně ovlivňovat nutriční hodnotu přijímané potravy a mít vliv na adaptaci roztočů na konzumaci hub, jak naznačil případ *Mucor racemosus* v této práci.

Všechny testy chitinázové aktivity homogenátu z těl roztočů v této práci byly jasně pozitivní. Tomu by odpovídalo i složení bakterií, které se z homogenátů podařilo izolovat (Tab. 1). Chitinolytická aktivita všech mnou izolovaných určených bakterií byla potvrzena i v odborné literatuře (Ho – Seong Lim et. al. 1991, Zhang a Zuen 2000, Khatuntseva et al. 2008).

Tabulka 1:

Potrava	Bakterie
<i>Protococcus</i> sp.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Protococcus</i> sp.	<i>Serratia marescens</i>
<i>Alternaria</i> sp	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
<i>Penicilium claviforme</i>	<i>Serratia marescens</i>
<i>Penicilium claviforme</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Verticillium</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Bakterie byly v tělech roztočů pozorovány ve všech oddílech trávicí soustavy včetně mesenterálních caec. Zároveň se ovšem v nezanedbatelných množstvích objevovaly v mezenchymu těl roztočů. Tento jev byl velmi významný u řasové diety (Obr. 6), *Alternaria* sp. (Obr. 16), *Penicillium claviforme* (Obr. 33), *Penicillium griseofulvum* (Obr. 36). K podobným výsledkům došel u stejného druhu roztoče Smrž (2003), který tesoval jako potravu kmeny *Alternaria* sp. a *Penicillium* sp. Oproti práci Šobotníka et. al. (2008), který u druhu *Acarus siro* pozoroval vláknité bakterie v postcolonických diventrikulech (postcolonic diventricula) a v intercolonu, jsem ve své práci žádný útvar, který by sloužil jako depozitum bakterií nepozorovala.

Vnější membrána, která v trávicí soustavě obaluje potravní bolus počínaje colonem, je u pancířníků označována jako mukoidní (mukózní) membrána (Smrž 2002b, Smrž a Norton

2004). V některých případech bolus v colonu tuto vrstvu neobsahoval (Obr. 33 – *Penicillium claviforme*). Toto může být způsobeno čerstvou přítomností potravy v colonu, kdy se membrána ještě nestačila vytvořit.

Šobotník et. al. (2008) podobnou strukturu pozoroval u acaroidního roztoče *Acarus siro* ji považuje za peritrofickou membránu.

Ve stěnách mesenterálních caec byly pozorovány stejné typy buněk, jako uvádí Šobotník et. al. (2008) u druhu *Acarus siro*. I v světelném mikroskopu byly vidět v S buňkách drobné vakuoly vznikající ve sphaeritech a mikrovili na povrchu S buněk. V D buňkách (D – digestive) byly dobře viditelné výrazné vakuoly. Proliferující S buňky byly pozorovány i ve stěně mesentera v případě *Penicillium griseofulvum*. Byly zaznamenány i struktury, které by mohly odpovídat sphaeritům (Obr. 36) a dalším strukturám uvnitř S buněk, podobně jak je popisuje Šobotník et. al. (2008). Pro jejich přesné určení ale byla světelná mikroskopie nedostatečná a bylo by nutné je prověřit pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

V ojedinělých případech roztoče vyplňovala masa bakterií (nebyla určena), která postupně omezovala vnitřní orgány. Smrž a Čatská (1989) tento jev zaznamenali u stejného druhu roztoče. V tomto případě se jednalo o bakterii *Alcaligenes faecalis*, která, jak jméno napovídá, silně zvyšuje pH prostředí. V jejich případě se jednalo o patologický jev, roztoči postupně snižovali pohybovou aktivitu a v závěrečné fázi jejich tělo vyplňovaly krystaly guaninu. Celý proces pak končil smrtí roztoče. První fázi tohoto procesu odpovídá i stav na obr. 2-5.

7 Přílohy

7.1 *Protococcus* (5. den a 10. den)

Obr. 1: 5. den na potravě. Sagitální řez. Mesenteron, mesenterální caecum. Potrava v mesenteru obsahující fragmenty hyf a spory. Mesenterální caeca s proliferujícími sekrečními buňkami (D buňky)

Obr. 2: 10. den. Celkový pohled. Sagitální řez. Situs orgánů trávicí soustavy. Mesenteron, colon, rectum. Všechny oddíly trávicí soustavy zaplněny potravou. Kolonie bakterií. Vajíčko.

Obr. 3: Sagitální řez v úrovni mesenterálního caeca.

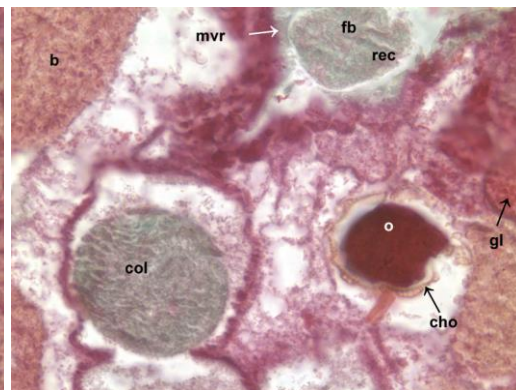
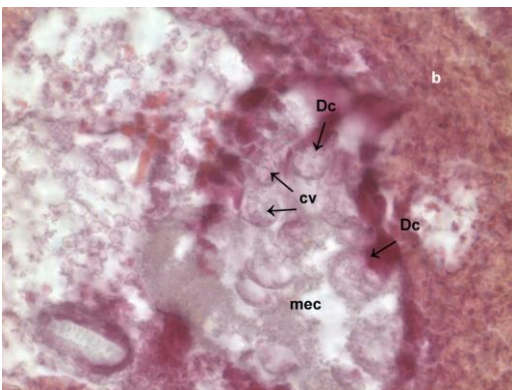
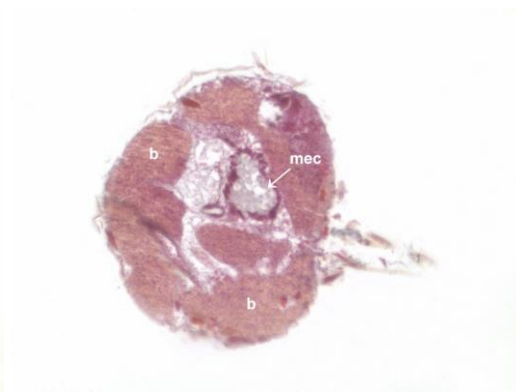
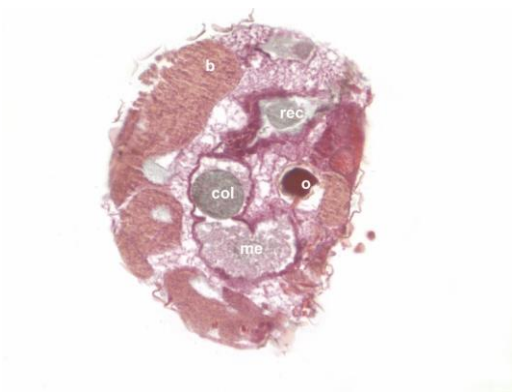
Obr. 4: Detail předchozího obrázku. Mesenterální caecum. Silná aktivita D buněk. Výrazné centrální vakuoly.

Obr. 5: Detailní pohled na trávicí soustavu. Colon, potravní bolus, rectum, mikrovili rektální stěny. Glykogenová granula. Kolonie bakterií. Vajíčko.

1	
2	3
4	5

Použité zkratky:

b – bakteriální kolonie
col - colon
cv – centrální vakuola D buňky
Dc – D buňka
fb – potravní bolus
gl – glykogenová granula
hy – fragmenty houbových hyf
cho - chorion
me – mesenteron
mec - mesenterální caecum
mv - microvili na povrchu S buněk
mvr – microvili rektální stěny
o – vajíčko
rec - rectum
Sc – S buňky
v – vakuoly s enzymy



7.2 *Protococcus* (10. den), *Alternaria* sp. (5. den)

Obr. 6: *Protococcus*. (10. den). Detail trávicí soustavy, sagitální řez. V potravě v mesenteronu patrné fragmenty buněk řas. Colon s kompaktním potravním bolem. Vajíčko. Asociované bakterie v mezenchymu.

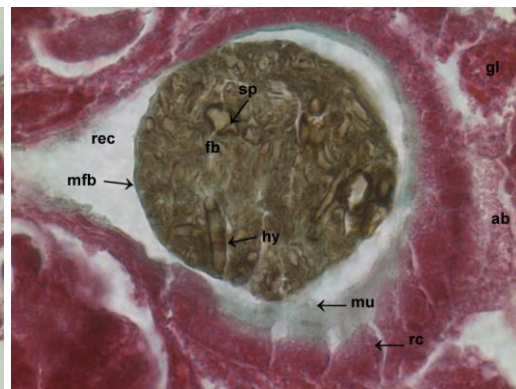
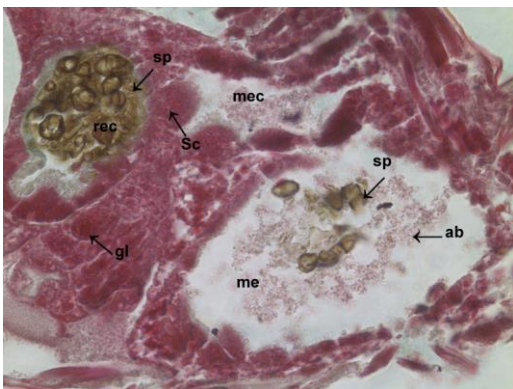
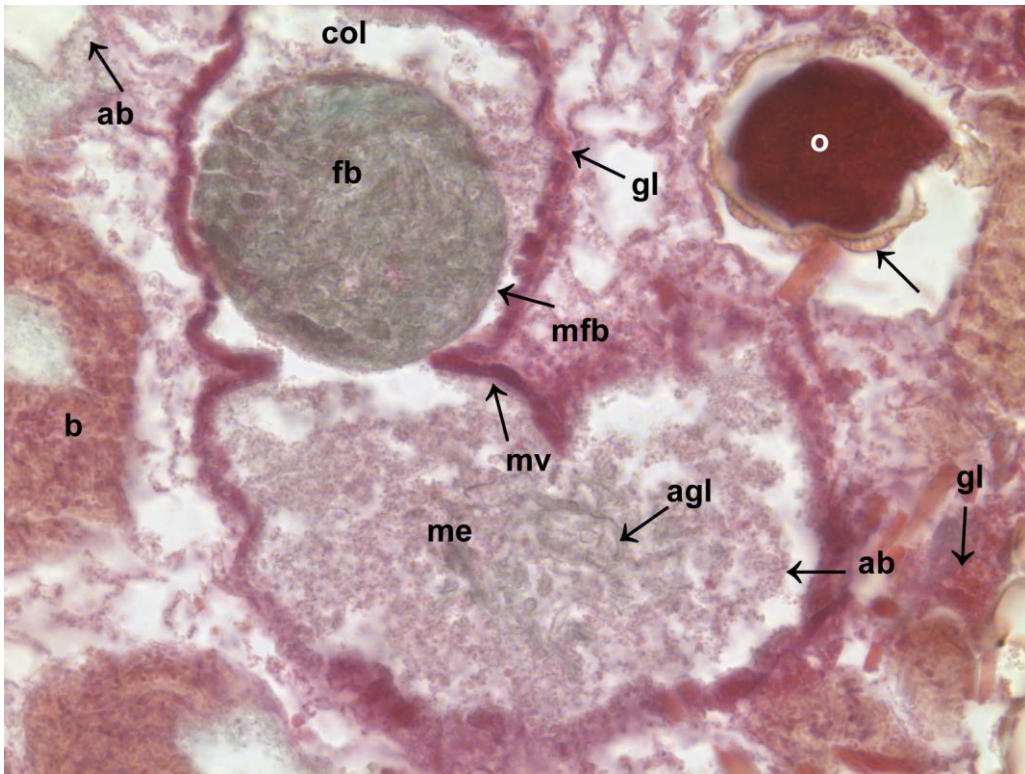
Obr. 7: *Alternaria* sp. (5. den), přibližně horizontální řez. Mesenteron, mesenterální caecum, rectum.

Obr. 8: *Alternaria* sp. (5. den). Rectum s kompaktním potravním bolem obaleným mukózními látkami.

6	
7	8

Použité zkratky:

ab – asociované bakterie
agl – fragmenty buněk řas
b – bakteriální kolonie
col - colon
fb – potravní bolus
gl – glykogenová granula
hy – fragmenty houbových hyf
cho - chorion
me – mesenteron
mec - mesenterální caecum
mfb – mukózní obal potravního boku
mu – mukózní látky
o – vajíčko
rec - rectum
Sc – S buňky
sp - spory



7.3 Alternaria sp. (5. den)

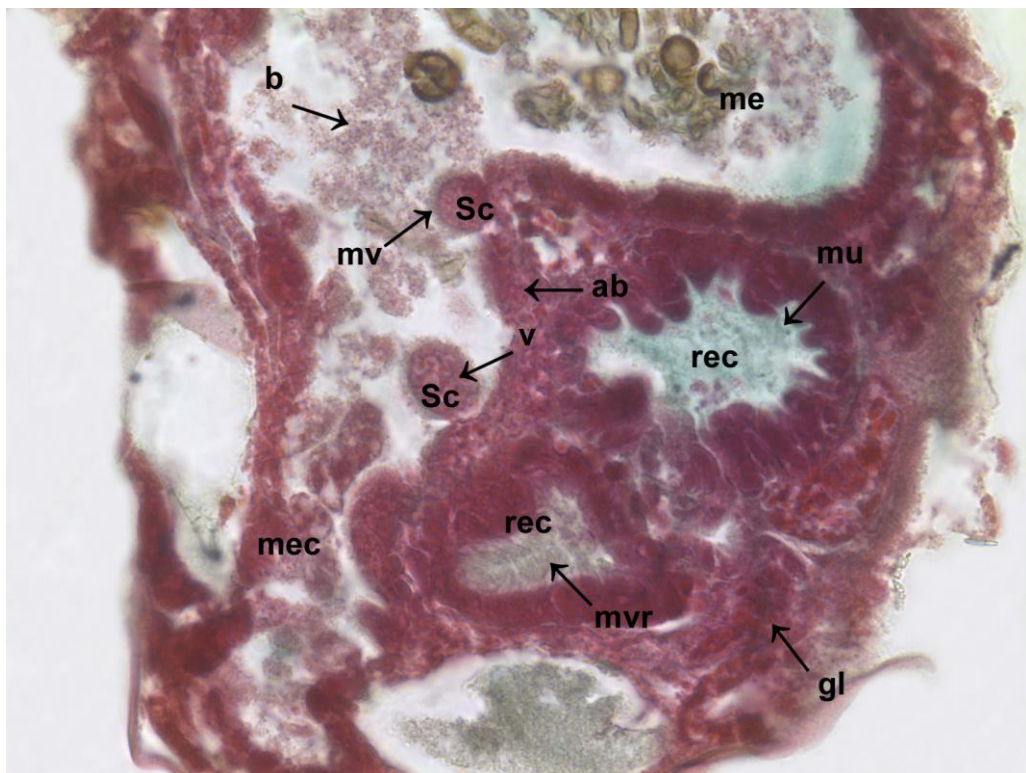
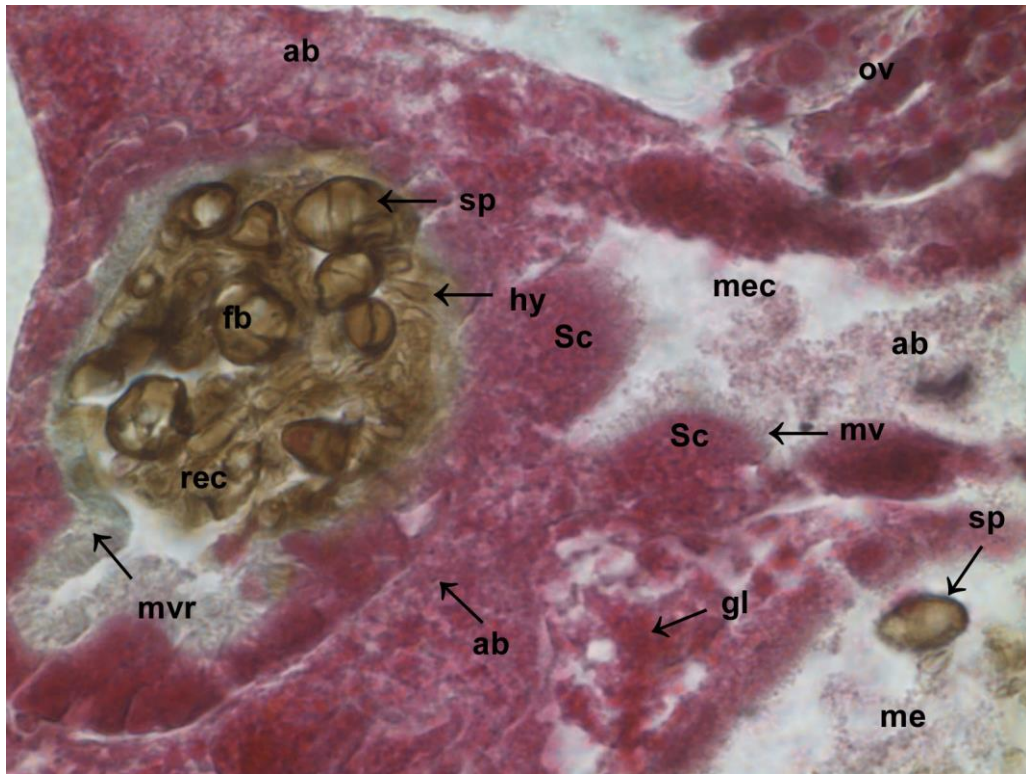
Obr. 9: Detail trávicí soustavy. Mesenteron, mesenterální caecum s S proliferujícími S buňkami. Rectum s kompaktním potravním bolem obsahujícím spory i fragmenty hyf. Asociované bakterie v caecu i v mezenchymu.

Obr. 10: Detail trávicí soustavy. Mesenteron řídce naplněn potravou, mesenterální caeca. Prázdné rectum.

9
10

Použité zkratky:

ab – asociované bakterie
b - bakterie
col - colon
fb – potravní bolus
gl – glykogenová granula
hy – fragmenty houbových hyf
me – mesenteron
mec - mesenterální caecum
mu – mukózní látky
mv – mikrovili na povrchu S buněk
mvr – mikrovili na povrchu rektální stěny
rec – rectum
Sc – S buňky
sp – spory



7.4 *Alternaria* sp. (5. den a 10. den)

Obr. 11: 5. den. Detail obsahu mesenteronu. Houbové fragmenty, bakterie.

Obr. 12: 5. den. Detail potravního bolu v silně naplněném mesentoronu.

Obr. 13: 10. den. Pohled na přední část trávicí soustavy.

Obr. 14: 10. den. Celkový pohled na situs orgánů. Sagitální řez. Pharynx, oesophagus, mesenteron, colon, rectum. Těleso asociovaných bakterií.

Obr. 15: 10. den. Detailní pohled na přední část jedince.

11	
12	13
14	15

Použité zkratky:

ab – asociované bakterie

col - colon

cv – centrální vakuola D buňky

gl – glykogenová granula

hy – fragmenty houbových hyf

me – mesenteron

mec - mesenterální caecum

mv - microvili na povrchu S buněk

oes – oesophagus

pha - pharynx

rec - rectum

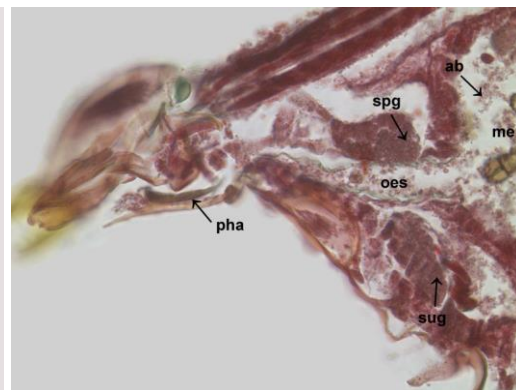
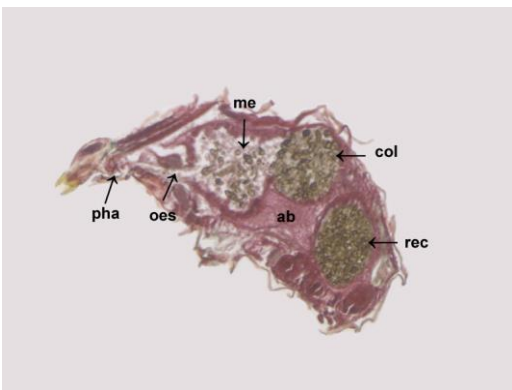
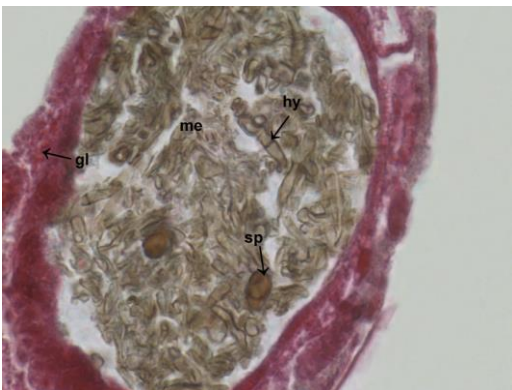
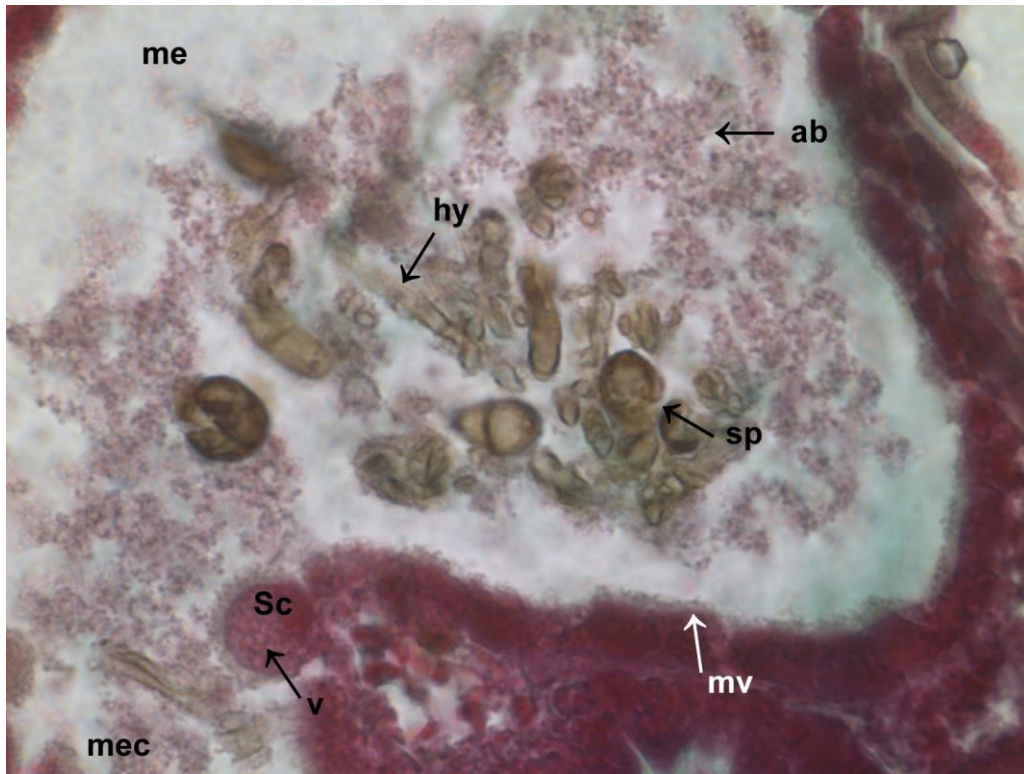
Sc – S buňky

Sp - spory

spg – suboesophageální ganglion

sug – supraoesophageální ganglion

v – vakuoly s enzymy



7.5 Alternaria (10. den)

Obr. 16: Detail mesentera a colonu naplněných potravou.

Obr. 17: Detail mesentera s potravou.

Obr. 18: Detail colonu s potravním bolem.

Obr. 19: Detail recta.

16	
17	
18	19

Použité zkratky:

ab – asociované balterie

col - colon

gl – glykogenová granula

hy – fragmenty houbových hyf

me – mesenteron

mec - mesenterální caecum

mu – mukózní látky

mv - microvili na povrchu S buněk

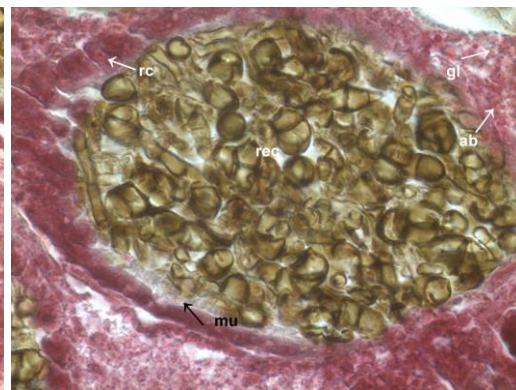
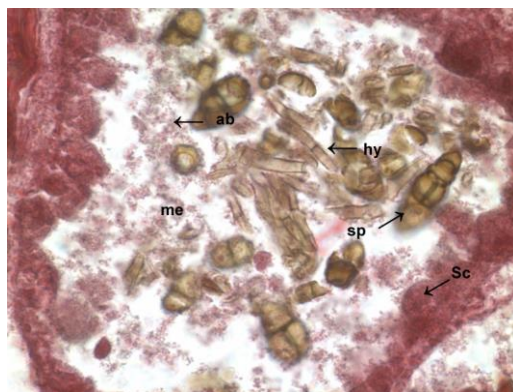
oes - oesophagus

rc – buňka stěny recta

rec - rectum

Sc – S buňky

sp – spory



7.6 *Fusarium oxysporum* (5. den a 10. den)

Obr. 20: 5. den. Deatilní pohled na mesenterální caecum s dobře viditelnými buněčnými strukturami. Rectum s potravním bolem.

Obr. 21: 5. den. Přibližně horizontální řez. Colon s potravním bolem, prázdné rectum s výraznými microvili. Mesenterální caecum.

Obr. 22: 10. den. Horizontální řez. Situs orgánů. Mesenterom, mesenterální caeca, rectum. Ovaria, vajíčka.

Obr. 23: 10. den. Detail potravy v mesenteronu.

Obr. 24: 10. den. Detailní pohled na mesenteron a mesenterální caecum. Proliferující D buňky, viditelné buněčné struktury trávicí soustavy.

20	21
22	23
24	

Použité zkratky:

col – colon

cv – centrální vakuola D buňky

Dc – D buňka

fb – potravní bolus

gl – glykogenová granula

hy – fragmenty houbových hyf

me – mesenteron

mec - mesenterální caecum

mfb – mukózní membrána na povrchu potravního bolu

mv - microvili na povrchu S buněk

nu – jádra buněk

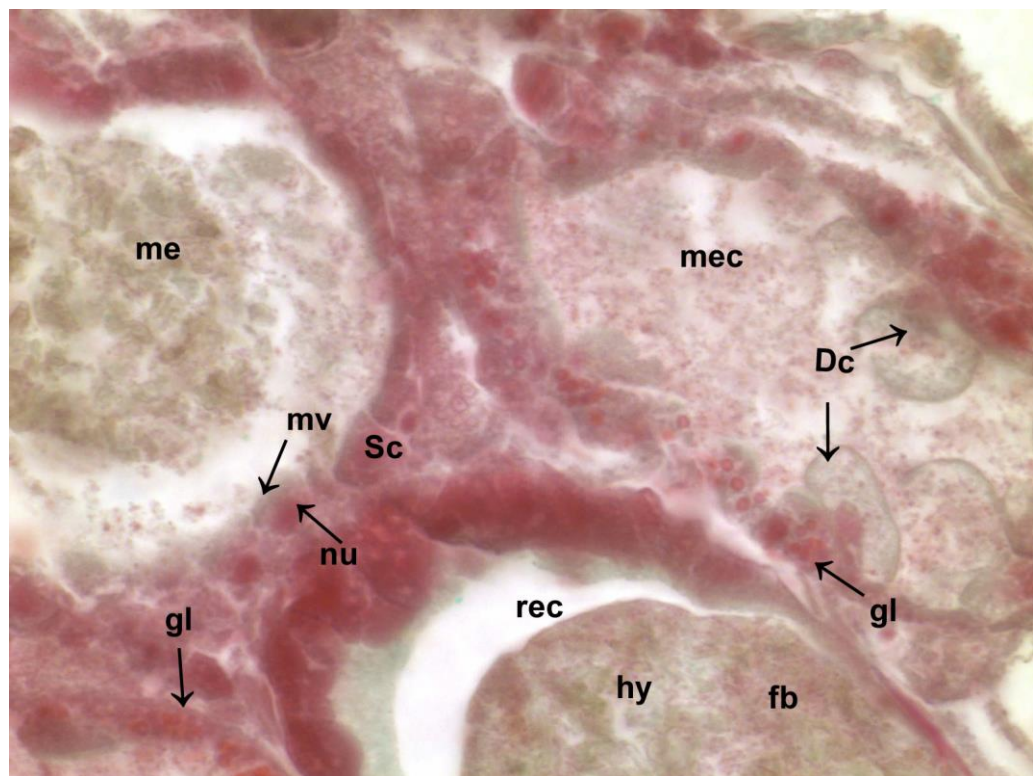
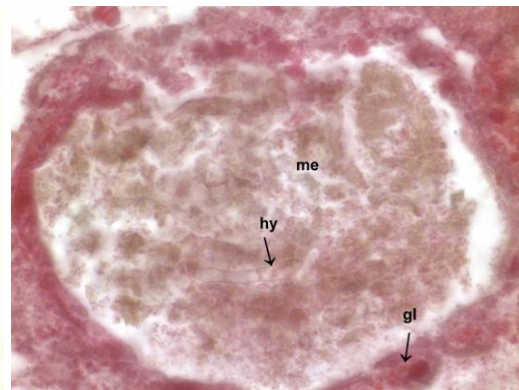
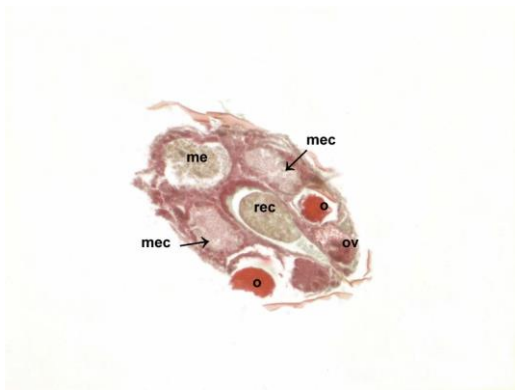
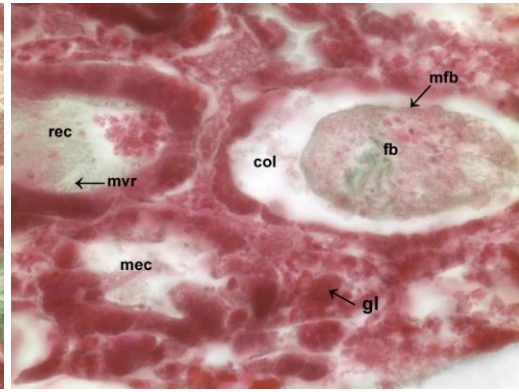
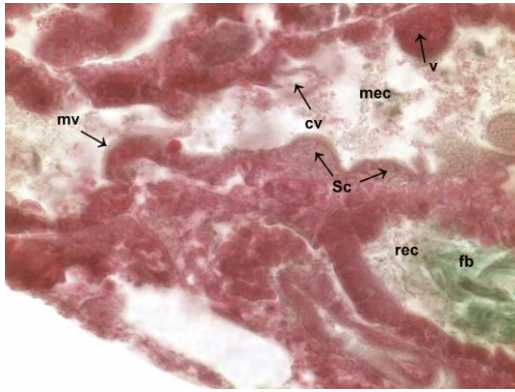
o – vajíčko

ov - ovaria

rec - rectum

Sc – S buňky

v – vakuoly s enzymy



7.7 *Fusarium oxysporum* (10. den), *Mucor racemosus* (5. den, 10. den), *Penicillium claviforme* (10. den)

Obr. 26: *Fusarium oxysporum* (10. den). Detail mesenterálního caeca a recta s potravním bolem.

Obr. 27: *Mucor racemosus* (5. den). Sagitální řez. Počátek trávicí soustavy. Pharynx, oesophagus, mesenteron. Supraoesophageální ganglion, suboesophageální ganglion.

Obr. 28: *Mucor racemosus* (5. den). Uspořádání trávicí soustavy na téměř sagitálním řezu.

Obr. 29: *Mucor racemosus* (5. den). Detail obsahu mesenteronu.

Obr. 30: *Mucor racemosus* (10. den). Horizontální řez. Celkový situs trávicí soustavy.

Obr. 31: *Mucor racemosus* (10. den). Detail potravního bolu v mesenteronu a rectu. Mesenterální caeca s aktivními D buňkami. Asociované bakterie.

Obr. 32: *Penicillium claviforme* (10. den). Detail obsahu mesenteronu.

26	27
28	29
30	31
32	

Použité zkratky:

ab – asociované bakterie

b – bakteriální kolonie

col - colon

Dc – D buňka

fb – potravní bolus

gl – glykogenová granula

hy – fragmenty houbových hyf

me – mesenteron

mec - mesenterální caecum

mv - microvili na povrchu S buněk

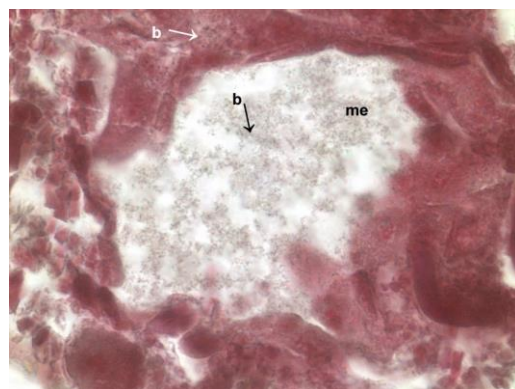
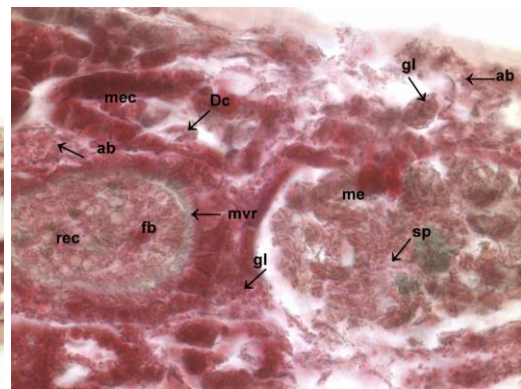
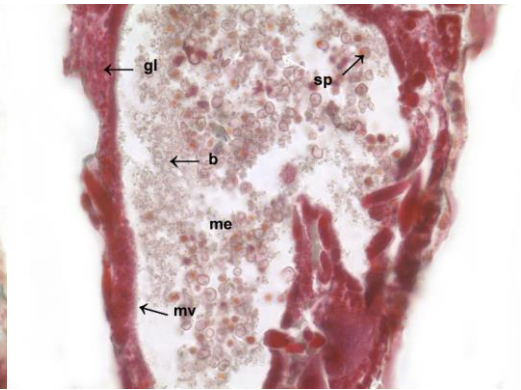
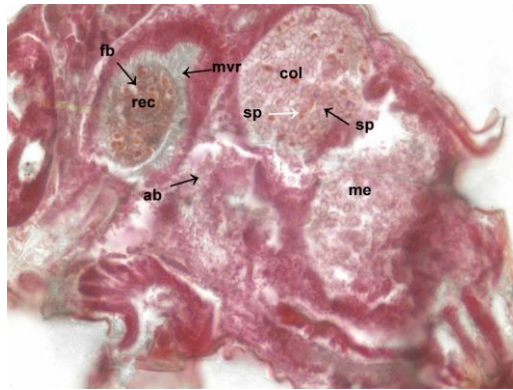
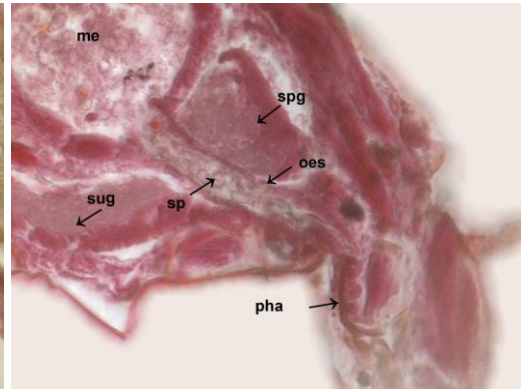
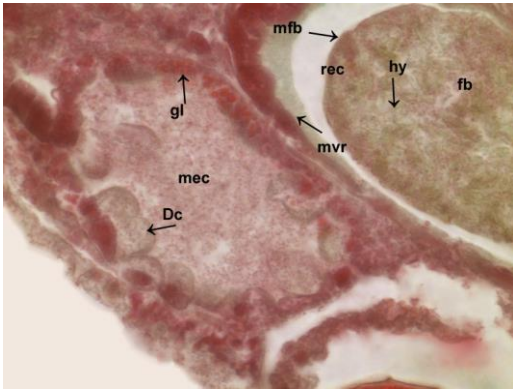
mvr – microvili rektální stěny

oes - oesophagus

rec – rectum

spg – supraoesophageální ganglion

sug – suboesophageální ganglion



7.8 *Penicillium claviforme* (10. den), *Penicillium griseofulvum* (5. den)

Obr. 33: *Penicillium claviforme*. 10. den. Sagitální řez. Mesenteron, mesenterální caeca, colon s potravním bolem a bakteriemi, rectum. Potravní bolus. Buněčné struktury trávicího traktu. Asociované bakterie.

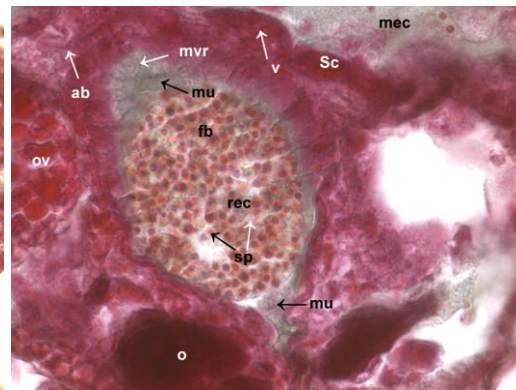
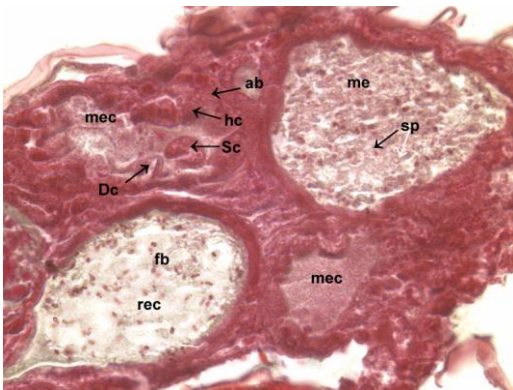
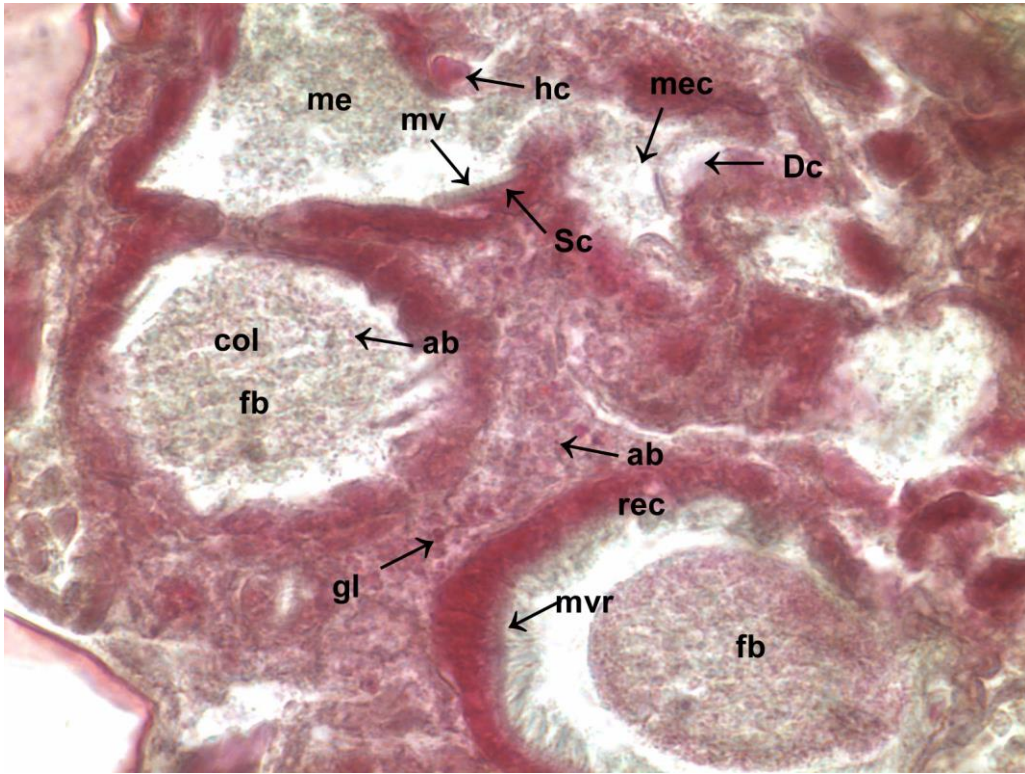
Obr. 34: *Penicillium griseofulvum*. 5. den. Celkový pohled na trávicí soustavu. Sagitální řez. Mesenteron, mesenterální caeca, rectum. D i S buňky, hemocyt.

Obr. 35: *Penicillium griseofulvum*. 5. den. Detail recta s potravním bolem. Mikrovili stěny recta, mukózní látky obalující bolus, spory. Ovarium, vajíčko. Bílá šipka označuje prázdné zatímco černá plné spory.

33	
34	35

Použité zkratky:

Ab – asociované bakterie
col - colon
Dc – D buňka
fb – potravní bolus
gl – glykogenová granula
hc - hemocyt
me – mesenteron
mec - mesenterální caecum
mv - microvili na povrchu S buněk
mvr – microvili rektální stěny
o – vajíčko
ov - ovarium
rec - rectum
Sc – S buňky
v – vakuoly s enzymy



7.9 *Penicillium griseofulvum* (5. den a 10. den)

Obr. 36: 5. den pokusu. Detail mesenterálního caeca, mesenteron, rectum, ovarium.

Obr. 37: 10. den pokusu. Sagitální řez. Mesenteron, colon, rectum. Potrava v trávicím traktu tvořená plnými i prázdnými sporami. Buňky mesentera a caec.

Obr. 38: Detail recta a mesenterálního caeca. Potravní bolus. Microvili. Proliferující S i D buňky.

36	
37	38

Použité zkratky:

ab – asociované bakterie

col - colon

Dc – D buňka

fb – potravní bolus

gl – glykogenová granula

me – mesenteron

mec - mesenterální caecum

mv - microvili na povrchu S buněk

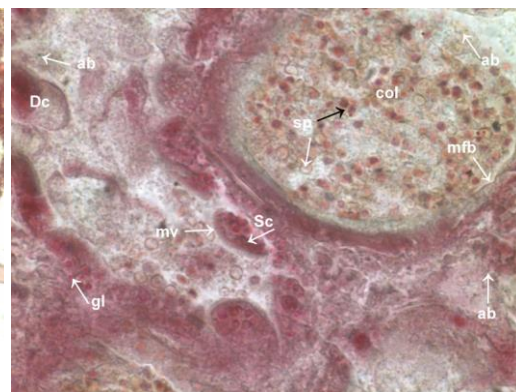
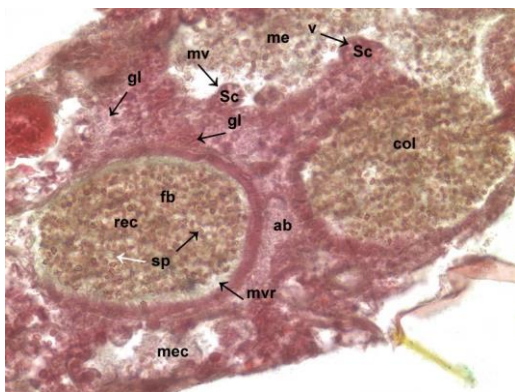
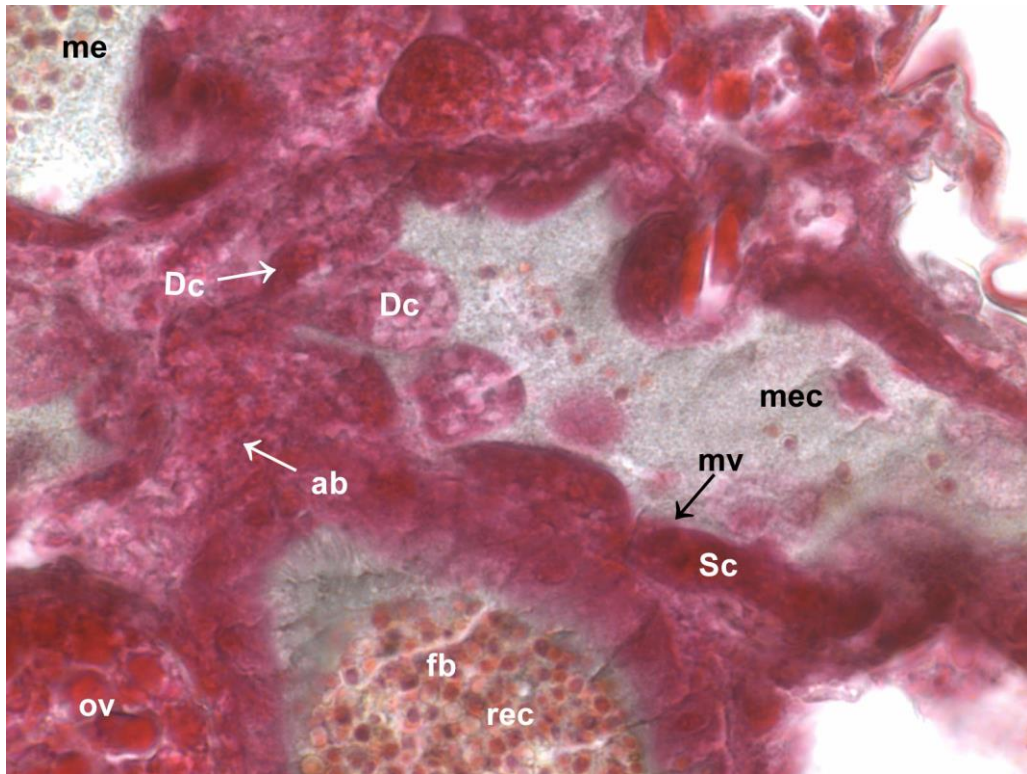
mvr – microvili rektální stěny

ov – ovarium

rec - rectum

Sc – S buňky

v – vakuoly s trávicími enzymy



7.10 Verticillium (10. den)

Obr. 39: Celkový pohled. Sagitální řez. Situs orgánů trávicího traktu. Mesenteron, colon, rectum, fekální bolus.

Obr. 40: Celkový pohled. Sagitální řez. Situs orgánů trávicího traktu. Mesenteron, colon, mesenterální caecum, chelicera.

Obr. 41: Sagitální řez. Mesenteron, colon, složení potravy, buňky asociovaných bakterií, glykogenová granula.

Obr. 42: Mesenteron s potravou, mesenterální caecum.

Obr. 43: Sagitální řez. Mesenteron, colon, potravní bolus.

39	40
41	42
43	

Použité zkratky:

ab – asociované bakterie

b – bakteriální kolonie

col - colon

Dc – D buňka

fb – potravní bolus

gl – glykogenová granula

che - chelicera

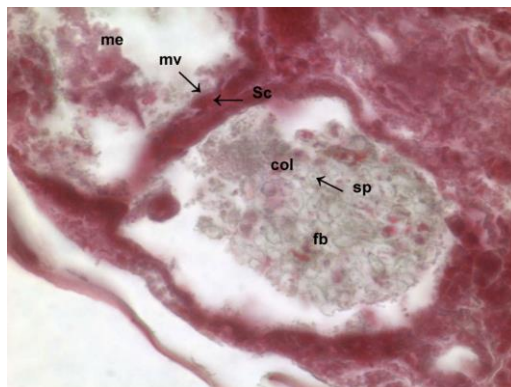
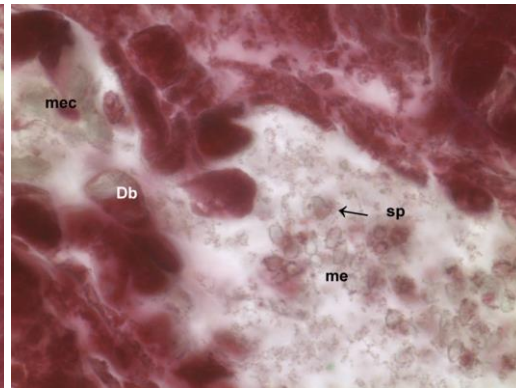
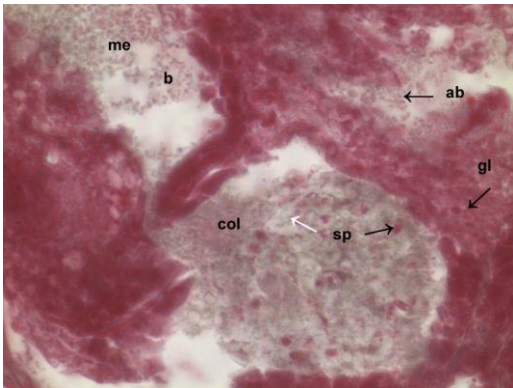
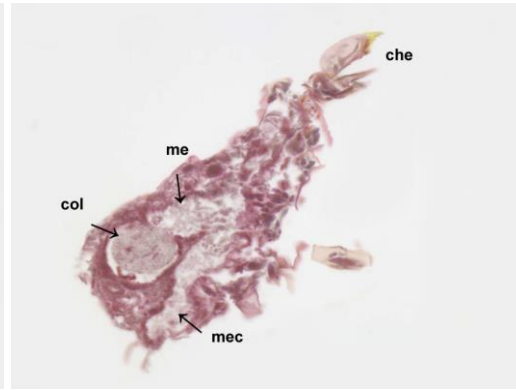
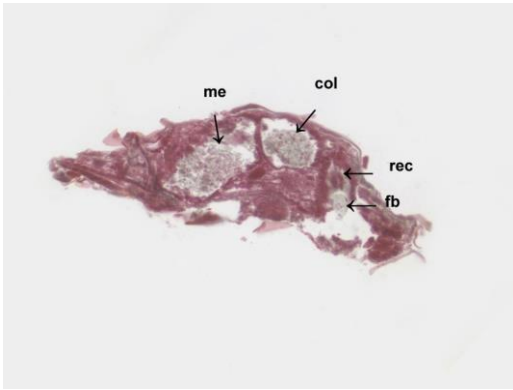
me – mesenteron

mec - mesenterální caecum

mv - microvili na povrchu S buněk

rec - rectum

Sc – S buňky



7.11 Fluorescence

Exkrementy po 10. dni jednotlivých pokusů.

Obr. 44: *Alternaria sp.* Živé bakterie, spory, živé fragmenty houbového původu.

Obr. 45: *Fusarium oxysporum.* Živé fragmenty houbových hyf.

Obr. 46: *Mucor recemosus.* Živé bakterie, živé spory.

Obr. 47: *Penicillium claviforme.* Živé bakterie, spory.

Obr. 48: *Penicillium griseofulvum.* Živé bakterie, živé i neživé spory.

Obr. 49: *Verticillium sp.* Živé bakterie, živé spory.

44	45
46	47
48	49

Použité zkratky:

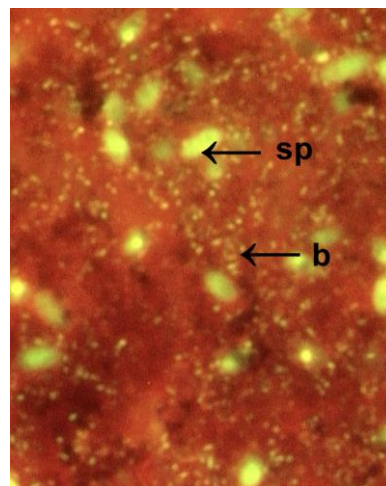
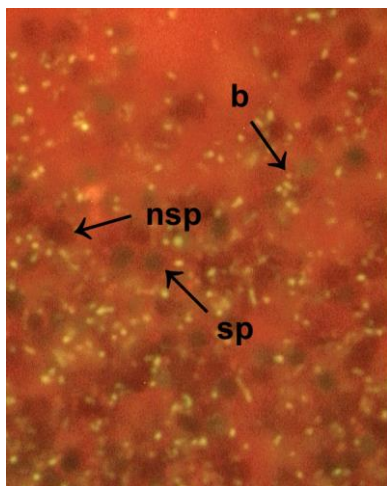
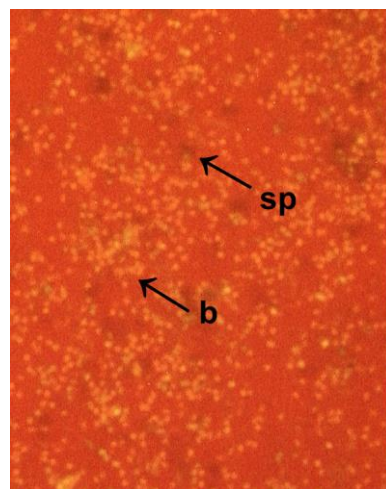
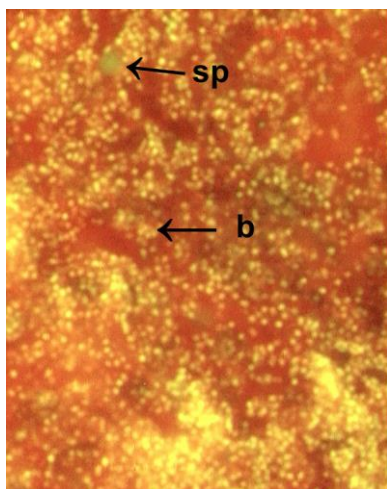
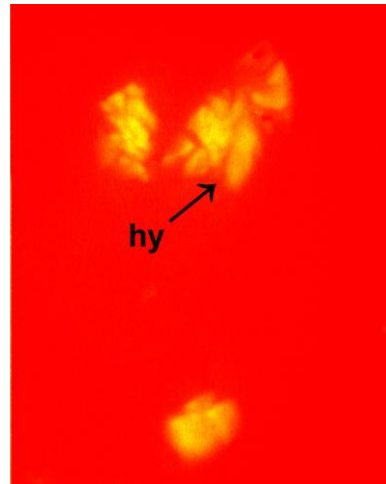
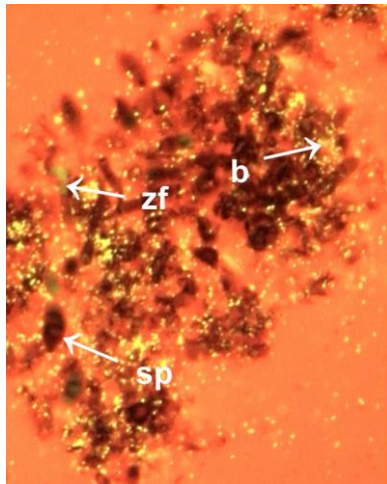
b – živé bakterie

hy – fragmenty houbových hyf

nsp – neživá spora

sp – spora

zf – živé fragmenty hub



7.12 Protococcus (10. den)

Obr. 50: *Tyrophagus putrescentiae* na kůře porostlé řasou.

Obr. 51: Detail předchozího snímku.

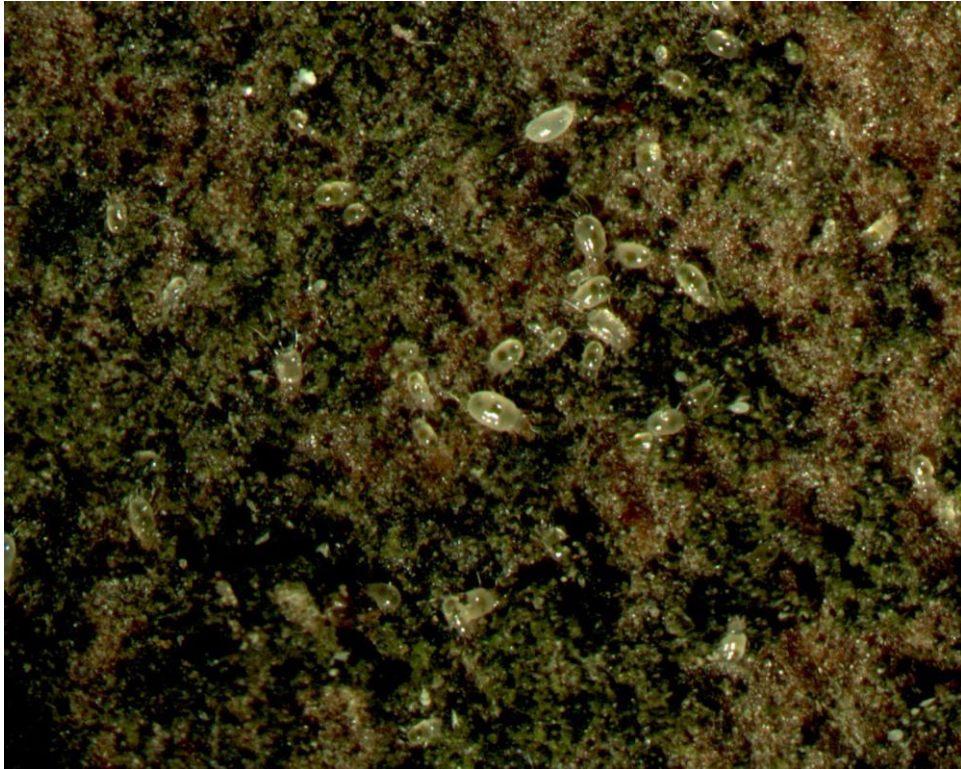
50
51

Použité zkratky:

col - colon

me – mesenteron

rec – rectum



7.13 Alternaria (10. den)

Obr. 52: Petriho miska s téměř zkonsumovanou kulturou *Alternaria sp.*

Obr. 53: Detail předchozího snímku. Na jedinci uprostřed patrný colon a rectum naplněné potravou. Jedinec vlevo dole vykazuje patologické namnožení bakterií.

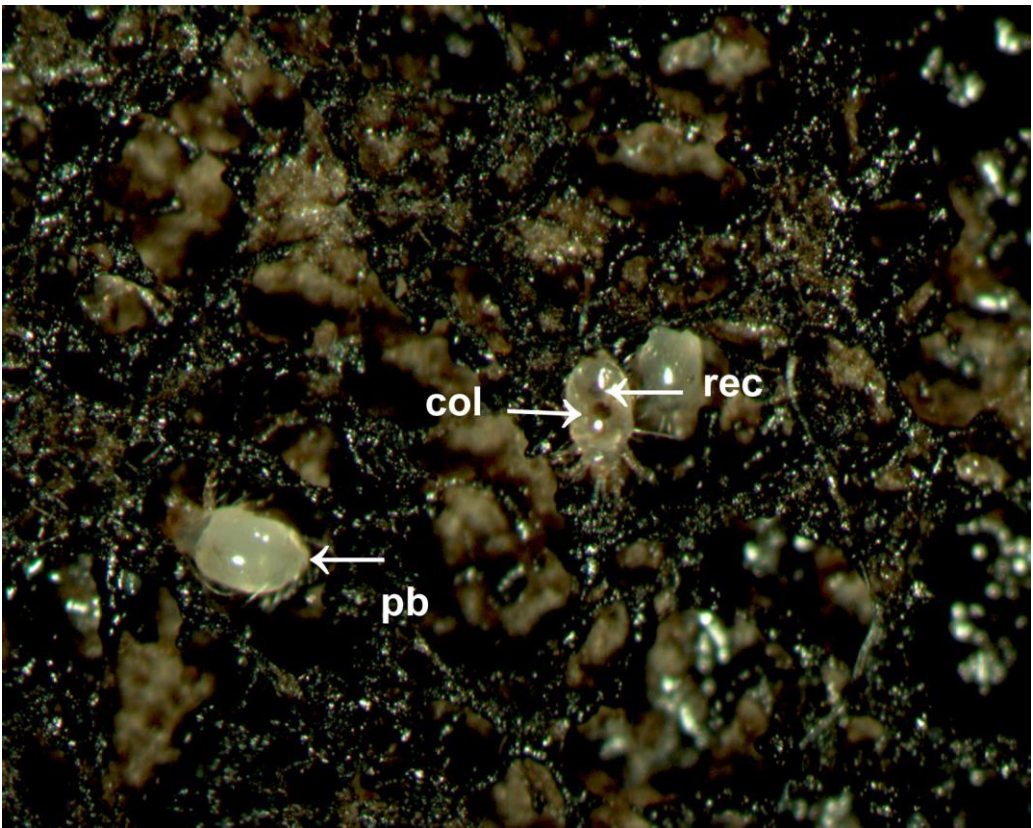
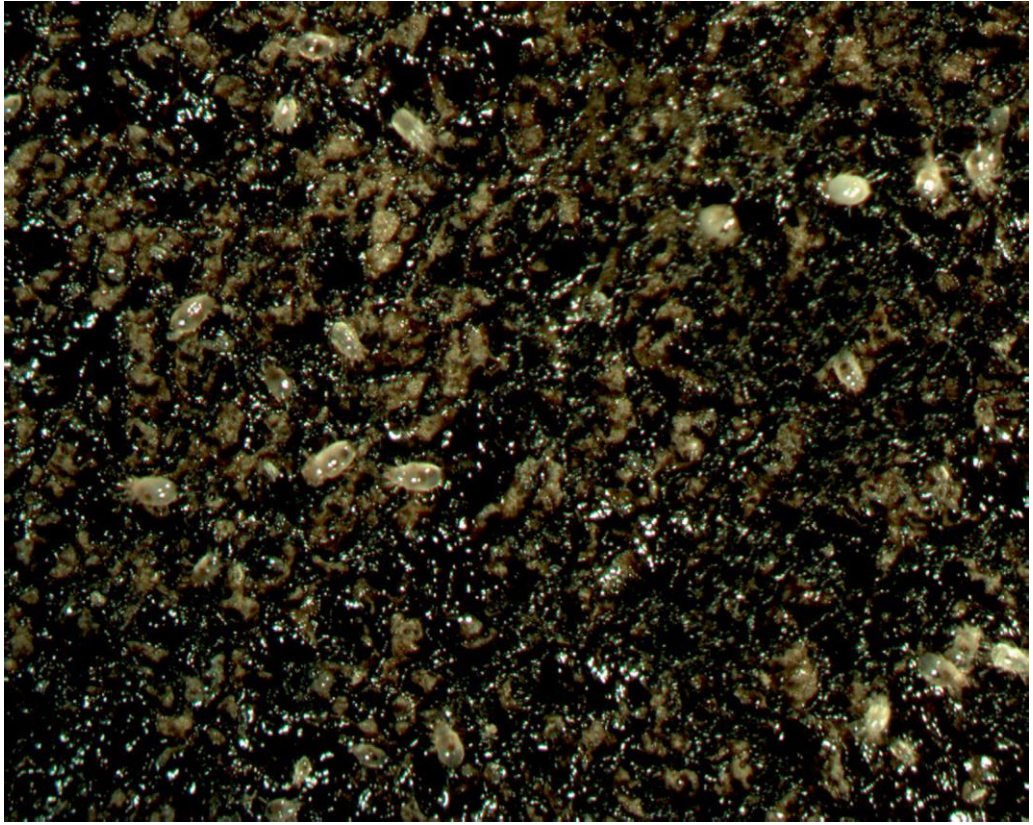
52
53

Použité zkratky:

col – colon

pb – patologické bakterie

rec – rectum



7.14 *Mucor racemosus* (5. den a 10. den)

Obr. 54: Petriho miska s téměř úplně zkonsumovanou kulturou *Mucor racemosus* po 10 dnech pokusu.

Obr. 55: detail předchozího snímku. Šipka ukazuje na bílá guaninová depozita v těle roztoče. V tomto případě jistě lethální.

54
55

Použité zkratky:

gua – guaninové krystaly



7.15 *Penicillium griseofulvum* (10. den)

Obr. 56: *Tyrophagus putrescentiae* na petriho misce s *P. griseofulvum* po 10. dni pokusu.

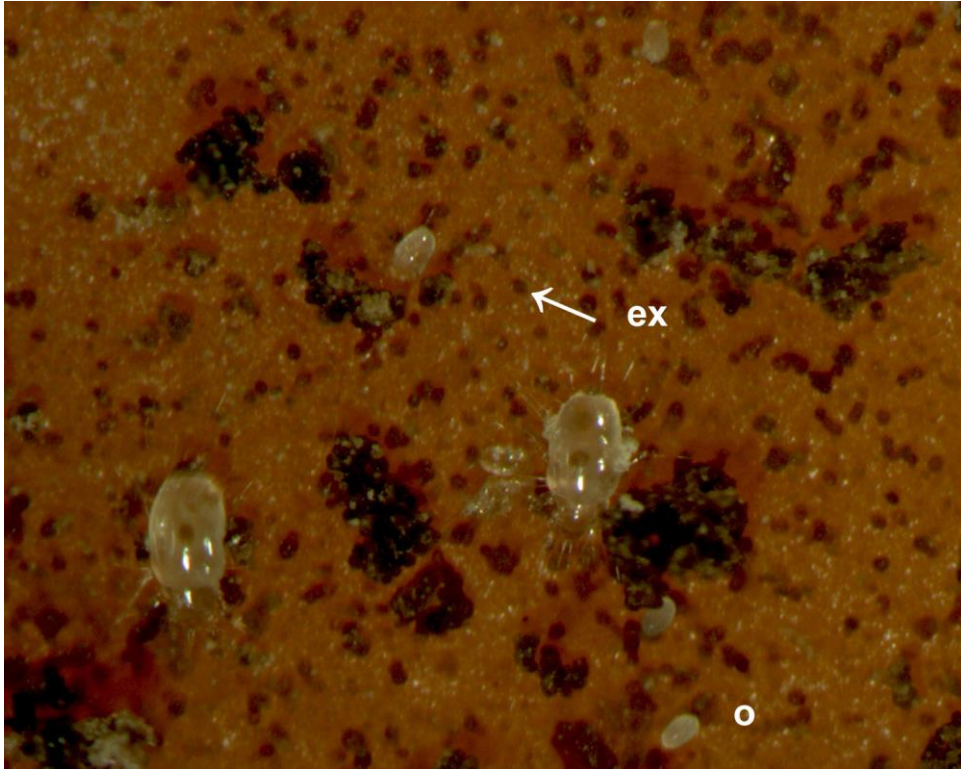
Obr. 57: *Tyrophagus putrescentiae*. Detail. Na povrchu nalepené bílé fragmenty mycelia.

58
57

Použité zkratky:

ex - exkrementy

o – vajíčko

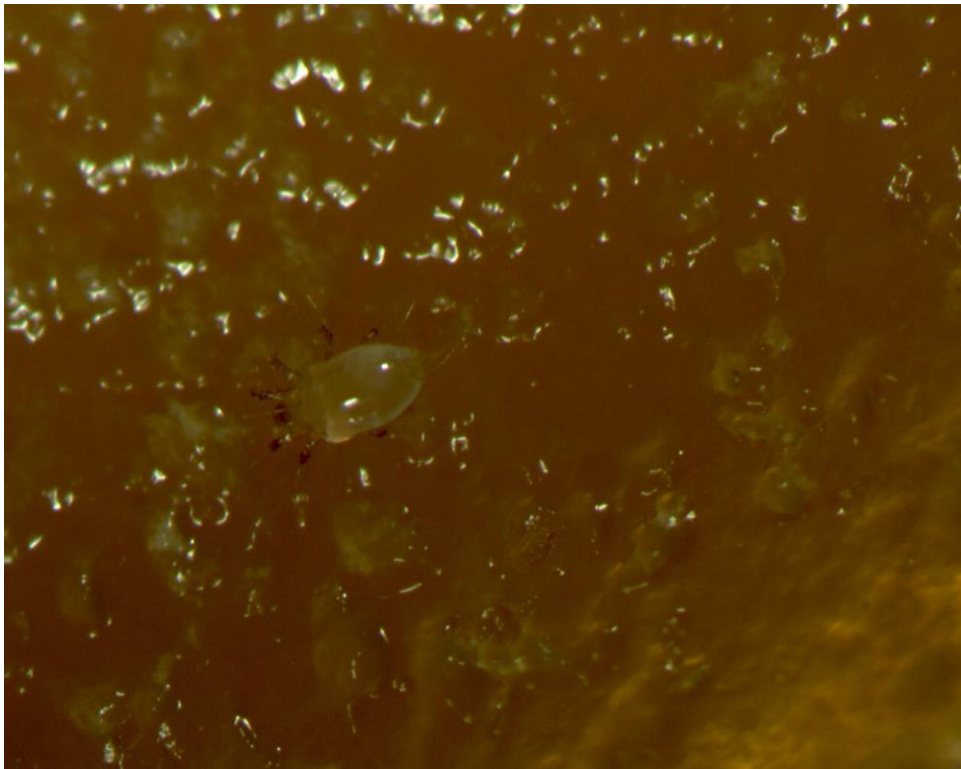
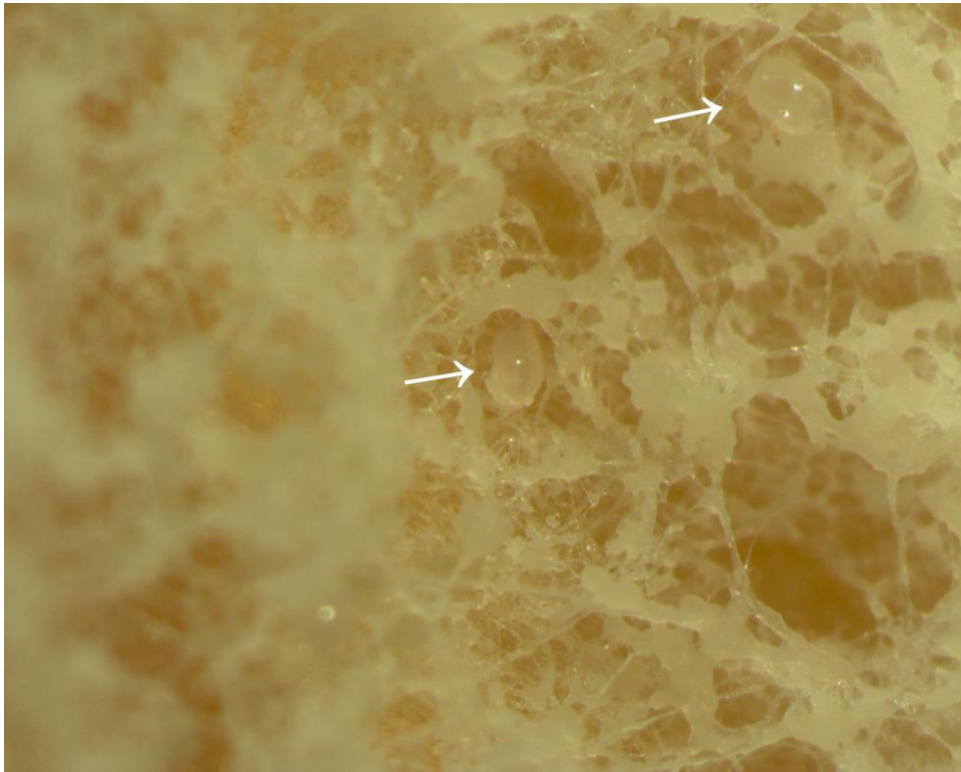


7.16 *Verticillium* (10. den), *Penicillium claviforme* (10. den)

Obr.58: *Tyrophagus putrescentiae* na *Verticillium* sp. Bílé šipky označují roztoče.

Obr. 59: *Tyrophagus putrescentiae* na *Penicillium claviforme*.

58
59



8 Seznam použité literatury

- **Abdel – Sater M. A., Eraky S. A., 2001:** Bulbs mycoflora and their relation with three stored product mites. *Mycopathologia* 153: 33 – 39.
- **Arlian L. G., Platts – Mills T. A. E., 2001:** The biology of dust mites and the remendiation of the mite alergens in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Vol. 107 No. 3: S406 – S413.
- **Czajkowska B., 1970:** Rozwój rozkruszkůw na niektorých gatunkach grzybůw. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln.* 109: 219 – 227.
- **Dueck L., Kaufman G., Palevsky E., Berdicevsky I., 2001:** Mites in fungal cultures. *Mycoses* 44: 390 – 394.
- **Erban T., Hubert J., 2008:** Digestive function of lysozym in synantropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. *Experimental and Applied Acarology* 44: 199 – 212.
- **Franzolin M. R., Gambale W., Cuero R. G. Correa B., 1999:** Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. *Journal of Stored products research* 35 (3): 215 – 224.
- **Ho - Seong Lim, Yong – Su Kim, Sang – Dal Kim, 1991:** *Pseudomonas stutzeri* YPL – I Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Applied Enviromental Microbiology* 57 (2): 510 – 516.
- **Hubert J., Jarošík V., Mourek J., Kubátová A., Žďárková E., 2004:** Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari: Acaridida): Comparisons in laboratory experiments. *Pedobiologia* 48:205 – 214.
- **Hubert J., Stejskal V., Lukáš J., 2002:** Význam jednotlivých skupin skladištních členovců jako producentů alergenů do uskladněného obilí v České republice. *Alergie* 1: 27 – 33.
- **Hubert J., Stejskal V., Kubátová A., Munzbergerová Z., Váňová M., Žďárková E., 2003:** Mites as selective fungal carriers in stores grain habitats. *Experimental and Applied Acarology* 29: 69 – 87.
- **Hubert J., Stejskal V., Munzbergová Z., Kubátová A., Váňová M., Žďárková E., 2004:** Mites and fungi in heavily infested stores in the Czech Republic. *Journal of Economic Entomology* 97 (6): 2144 – 2153.
- **Hubert J., Šustr V., Smrž J., 1999:** Feeding of the oribatid mite *Scheloribates laevigatus* (Acari : Oribatida) in laboratory experiments. *Pedobiologia* 43 (4): 328 – 339.
- **Hughes A., M., 1976:** The mites of stored food. Ministry od Agricultures, Fiheries and Food. Technical Bulletin No 9: 50 – 57.
- **Jírovec O., 1958:** Zoologická technika. SPN, Praha. 293 str.
- **Khatuntseva S. A., Eldarov M. A., Redo V. a., Skryabin K. G., 2008:** Purification and immobilization of recombinant variants of *Brevundimonas diminuta* glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expressed in *Escherichia coli* cells. *Journal of Biotechnology* 133 (1), 123 – 126.
- **Mourek J., 2000:** Půdní pancířníci (Acari, Oribatida) primárních borů a porostů introdukované borovice vejmutovky (pinus strobus) v NP České Švýcarsko. Diplomová práce. PřF UK. Praha. 294 s.
- **Parkinson C. L., Jamieson N., Eborall J., Armirage D. M., 1991:** Comparison of the Fecundity of 3 – species of grain store mites on fungal diets. *Experimental and Applied Acarology* 12 (3-4): 297 – 392.

- **Rosický B., Černý V., Daniel M., Dusbábek F., Palička P., Samšínák K., 1979:** Roztoči a klišťata škodící zdraví člověka. Academia Praha. 212 str.
- **Samšínák K., Dusbábek F., Vobrázková E., 1972:** Note on the house dust mites in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* 19: 383 – 384.
- **Schneider K., Migge S., Norton R. A., Scheu S., Langel R., Reineking A., Maraun M., 2004:** Trophic niche differentiation in soil microarthropods (Oribatida, Acari): evidence from stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1769 – 1774.
- **Shatrov A. B., 2003:** Comparative midgut ultrastructure of unfed larvae and adult mites of *Platythrombidium fasciatum* (C. L. Koch, 1836) and *Camerotrombidium pexatum* (C. L. Koch, 1837) (Acariformes: Microtrombidiidae). *Arthropod Structure and Development* 32: 227 – 239.
- **Siepel H., de Ruiter – Dijkman E. M., 1993:** Feeding guilds of oribatid mites based on their carbohydrase activities. *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 25 No. 11: 1491 – 1497.
- **Smrž J., 1989:** Internal anatomy of *Hypochothonius rufus* (Acari, Oribatida). *Journal of Morphology* 200: 215 – 230.
- **Smrž J., 1991:** Srovnávací a funkční mikroanatomie půdních roztočů podřádů Oribatida a Acaridida (Acari). Habilitační práce. PřF UK, Praha. 162 s.
- **Smrž J., 1995:** Free cells in the body cavity of oribatid mites (Acari: Oribatida). *Pedobiologia* 39 (6): 488 – 495.
- **Smrž J., 1998:** Interactions between oribatids and micro – organisms: A complex method of study. *Applied Soil Ecology* 9: 109 – 110.
- **Smrž J., 2000:** A modified test for chitinase and cellulase activity in soil mites. *Pedobiologia* 44: 186 – 189.
- **Smrž J., 2002a:** The excrement analysis – the useful tool for the biological and autecological studies in soil zoology. In: Tajovský K., Balík V., Pižl V. (Eds.): *Studies on Soil Fauna in Central Europe* str.: 185 – 189.
- **Smrž J., 2002 b:** Nutritional biology: the basic step in the autecological studies (multi – methodical approach). *European Journal of Soil Biology* 38: 35 – 38.
- **Smrž J., 2003:** Microanatomical and biological aspects of bacterial associations in *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida). *Experimental and Applied Acarology* 31: 105 – 113.
- **Smrž J., 2006:** Types of haemocytes in saphrophagous soil mites (Acari: Oribatida, Acaridida) and correlation between their presence and certain processes within mites. *European Journal of Entomology* 103 (3): 679 – 686.
- **Smrž J., Čatská V., 1987:** Food selection of the field population of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari, Acaridida). *Journal of Applied Entomology* 104: 329 – 335.
- **Smrž J., Čatská V., 1989:** The effect of the consumption of some soil fungi on the internal microanatomy of the mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridida). *Acta Univ. Carol. Biol.* 33: 81 – 93.
- **Smrž J., Norton R. A., 2004:** Food selection and internal processing in *Archegeozetes longisetosus* (Acari: Oribatida). *Pedobiologia* 48: 111 – 120.
- **Smrž J., Soukalová H., 2008:** Mycophagous mites (Acari: Oribatida and Acaridida) and their cooperation with chitinolytic bacteria. In: Bertrand M., McCoy K. D., Migeon A., Navajas M., Tixier M. S., Vial L. (Eds.): *Integrative Acarology. Proceedings of the 6th European Congress* str.: 359 – 362.

- **Smrž J., Svobodová J., Čatská V., 1991:** Synergic participation of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari, Acaridida) and its associated bacteria on the destruction of the some soil micromycetes. *Journal of Applied Entomology* 111 (2): 206 – 210.
- **Šobotník J., Alberti G., Weyda F., Hubert J., 2008:** Ultrastructure of the Digestive Tract in *Acarus siro* (Acari: Acaridida). *Journal of Morphology* 269: 54 – 71.
- **Van Asselt L., 1999:** Interactions between domestic mites and fungi. *Indoor and built Environment* 8 (4): 216 – 220.
- **Zhang Z., Yuen G. Y., 2000:** The Role of Chitinase Production by *Stenotrophomonas malhophilia* Strain C3 in Biological Control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology* 90 (4): 384 – 389.
- **Zhang Y. Y., Sun X., Liu Z. G., 2008:** Morphology and three – dimensional reconstruction of the digestive system of *Dermatophagoides farinae*. *International Archives of Allergy and Immunology* 146 (3): 219 – 226.